



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/16487>

To cite this version :

Amblard, Océane. *Étude de la diffusion in vivo de Mycoplasma agalactiae chez la brebis : essai préliminaire*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 72 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ANNEE 2016 THESE : 2016 – TOU 3 – 4055

ETUDE DE LA DIFFUSION *IN VIVO* DE *MYCOPLASMA AGALACTIAE* CHEZ LA BREBIS : ESSAI PRÉLIMINAIRE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

AMBLARD Océane

Née, le 07 février 1990 à Clermont-Ferrand (63)

Directeur de thèse : M. Xavier BERTHELOT

JURY

PRESIDENT :
M. Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEURS :
M. Xavier BERTHELOT
M. Xavier NOUVEL

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
Mme Laura FERNANDEZ

Docteur Vétérinaire à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 06/09/2016

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES- MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Hélène, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

A notre président de thèse,

Monsieur le professeur Jacques IZOPET

Professeur de virologie à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse ;

Hommage respectueux.

A notre jury de thèse,

Monsieur le professeur Xavier BERTHELOT,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la Reproduction,

Qu'il reçoive le témoignage de toute ma reconnaissance pour son enseignement, ses conseils, sa disponibilité et son soutien dans la réalisation de ce travail.

Monsieur le docteur Xavier NOUVEL

Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la Reproduction

Qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être jury de thèse.

Madame le docteur Laura FERNANDEZ

Docteur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie du bétail

Qu'elle reçoive le témoignage de toute ma reconnaissance pour son aide et son soutien dans la réalisation de ce travail.

Mes sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire de pathologie de la reproduction et du bétail pour leur aide et leurs conseils. Je remercie en particulier Marie-Claude, Laura et le professeur Berthelot.

Table des matières

1	Introduction.....	11
2	Matériels et méthodes	14
2.1	Animaux	14
2.1.1	Choix des animaux.....	14
2.1.2	Conduite des animaux.....	15
2.1.2.1	Logement	15
2.1.2.2	Alimentation	15
2.1.2.3	Manipulation des animaux lors des prélèvements	15
2.2	Inoculum et inoculation	16
2.3	Suivi.....	17
2.3.1	Suivi clinique	17
2.3.2	Prélèvements	18
2.4	Analyses ante-mortem	19
2.4.1	Analyses du lait.....	19
2.4.1.1	Bactériologie.....	19
2.4.1.2	Colony blot	21
2.4.1.3	PCR.....	22
2.4.2	Analyses du sang des brebis et agneaux : western blot	25
2.4.3	Calendrier des analyses de laboratoire.....	25

2.5	Analyses post-mortem	26
2.5.1	Euthanasie et autopsie	26
2.5.2	Analyses des nœuds lymphatiques.....	27
2.5.2.1	Bactériologie	27
2.5.2.2	PCR.....	28
2.5.3	Analyses des écouvillons	30
3	Résultats	31
3.1	Suivi.....	31
3.1.1	Suivi clinique	31
3.1.2	Analyses du lait.....	33
3.1.2.1	Bactériologie	33
3.1.2.2	Colony blot	35
3.1.2.3	PCR.....	37
3.1.3	Analyses du sang des brebis et agneaux : western blot	38
3.2	Post-mortem.....	39
3.2.1	Autopsies.....	39
3.2.1.1	Etat général	39
3.2.1.2	Articulations et mamelles	39
3.2.1.3	Nœuds lymphatiques.....	40

3.2.2	Analyses des nœuds lymphatiques.....	42
3.2.2.1	Bactériologie classique	42
3.2.2.2	PCR.....	44
3.2.3	Analyses des écouvillons	48
4	Discussion	50
4.1	Discussion du matériel et méthodes	50
4.1.1	Choix des animaux.....	50
4.1.1.1	Race	50
4.1.1.2	Stade physiologique	50
4.1.2	Conduite des animaux.....	51
4.1.3	Protocole d'inoculation.....	52
4.1.3.1	Choix des souches.....	52
4.1.3.2	Titre d'inoculation	52
4.1.3.3	Voie d'inoculation	53
4.1.4	Conduite de l'expérimentation.....	54
4.1.4.1	Durée de l'expérimentation	54
4.1.4.2	Suivi clinique et prélèvements.....	54
4.1.4.3	Autopsie.....	55

4.2	Discussion des résultats	56
4.2.1	Analyses de lait	56
4.2.1.1	Bactériologie classique	56
4.2.1.2	Colony blot	56
4.2.1.3	PCR.....	57
4.2.2	Suivi clinique	58
4.2.3	Western blot	59
4.2.4	Autopsie	59
4.2.5	Analyse post-mortem	60
4.2.5.1	Bactériologie et PCR des nœuds lymphatiques	60
4.2.5.2	PCR des écouvillons	62
4.3	Perspectives	64
5	Conclusion	66
6	Bibliographie.....	68
7	Annexes.....	71
7.1	Annexe 1 : Tableaux des suivis cliniques des brebis.....	71
7.2	Annexes 2 : Courbes de température	72

Tableau 1 : Positivité des souches selon l'amorce de la PCR.....	23
Tableau 2: Examen clinique des brebis	31
Tableau 3 : Résultats des analyses bactériologiques classiques sur le lait frais des brebis	34
Tableau 4: Résultats des Colony Blot sur le lait des brebis	36
Tableau 5 : Résultats des PCR sur le lait.....	37
Tableau 6 : Description des nœuds lymphatiques des brebis	40
Tableau 7 : Description macroscopique des nœuds lymphatiques des agneaux	41
Tableau 8 : Résultats des cultures sur les organes des brebis.....	42
Tableau 9 : Résultats des cultures sur organes des agneaux	43
Tableau 10 : Résultats PCR directes sur les nœuds lymphatiques de brebis.....	44
Tableau 11 : Résultats PCR après culture sur les nœuds lymphatiques de brebis.....	45
Tableau 12 : Résultats PCR directes sur les nœuds lymphatiques des agneaux	46
Tableau 13 : Résultats PCR après culture sur les nœuds lymphatiques des agneaux ..	47
Tableau 14 : Résultats des PCR sur les écouvillons des brebis.....	48
Tableau 15 : Résultats de PCR sur les écouvillons des agneaux.....	49

Figure 1 : Plan d'échantillonnage.....	18
Figure 2 : Schéma expérimental des bactériologies de lait	20
Figure 3 : Plan des Colony Blot	21
Figure 4 : Schéma expérimental des PCR sur les échantillons de lait.....	24
Figure 5 : Calendrier de réalisation des analyses de laboratoire	25
Figure 6 : Schéma expérimental des analyses des nœuds lymphatiques.....	29
Figure 7: Courbes des températures au cours des examens cliniques	32
Figure 8: Résultats du western blot pour la souche PG2.....	38
Figure 9 : Résultats Western Blot pour la souche 5632	38
Figure 10 : Proposition d'une organisation en case individuelle	64
Figure 11 : Courbe des températures de toutes les brebis	72
Photo 1 : Brebis numérotées dans leur box (O. Amblard)	16
Photo 2 : Noeud lymphatique pré-scapulaire abcédé (O. Amblard)	26
Photo 3 : Tonsille palatine d'un agneau (O. Amblard)	26
Photo 4 : Ecouvillon oculaire (O. Amblard)	27

1 Introduction

Le genre *Mycoplasma* regroupe des bactéries ayant la même caractéristique : l'absence de paroi cellulaire. Les mycoplasmes appartiennent à la classe des *Mollicutes* et ont évolué à partir d'ancêtres Gram positif par d'importantes pertes de matériel génétique (Baranowski et al., 2014). Le génome de ces organismes est remarquablement petit : les mycoplasmes sont considérés comme les plus petits organismes capables de réplication indépendante (Razin et al., 1998). Ces bactéries sont reconnues comme les plus petits et les plus simples organismes. Les mycoplasmes sont très spécifiques de leur hôte et sont capables d'établir des infections chroniques chez les hommes comme chez les animaux (Razin et al., 1998).

Parmi les mycoplasmes pathogènes en médecine vétérinaire, nous retrouvons les agents responsables de l'agalaxie contagieuse. Le principal agent étiologique est *Mycoplasma agalactiae* chez les ovins auquel s'ajoutent *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* et *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* chez les caprins (Bergonier et al., 1997).

L'agalaxie contagieuse des petits ruminants est un syndrome affectant les mamelles (causant une mammite ainsi qu'une agalaxie), les articulations (arthrite) et les yeux (kératite et conjonctivite) voire l'appareil respiratoire (surtout chez les caprins) et l'appareil génital. Cette mycoplasmose a un impact économique important et est inscrite sur la liste de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) ; en France, elle est classée comme un danger sanitaire de deuxième catégorie en Aquitaine (AM du 17 février 2015). Les pertes économiques sont dues principalement à la perte de production de lait mais également à la perte de GMQ voire à la mortalité des agneaux par manque d'alimentation (Gómez-Martín et al., 2013).

L'agalaxie contagieuse est présente partout dans le monde. Cependant, la région du monde où elle est le plus présente reste, et ce depuis longtemps, le bassin Méditerranéen (Kumar et al., 2014). En France, *Mycoplasma agalactiae* a été mis en évidence, sous forme enzootique, en Savoie et Haute-Savoie ainsi que dans les Pyrénées-Atlantiques. Depuis 2002, l'enzootie, dans les Alpes, qui touchait principalement les chèvres, semble circonscrite alors que la situation est beaucoup plus préoccupante dans les Pyrénées-Atlantiques (Groupe de travail « Agalactie contagieuse dans les Pyrénées-Atlantiques », 2011).

Les cheptels infectés constituent la source de contamination des cheptels indemnes via les sécrétions nasales, oculaires, auriculaires et génitales ainsi que les fèces, le lait et l'urine (Bergonier et al., 1997). L'agalaxie contagieuse se transmet par contact avec l'animal excréteur, qu'il soit malade, infecté chronique ou porteur sain (Kumar et al., 2014) (Groupe de travail «Agalaxie contagieuse dans les Pyrénées-Atlantiques», 2011). Les femelles en lactation présentent le tableau clinique le plus typique mais la maladie peut également atteindre les jeunes ou les animaux débilités. Les femelles en lactation représentent la source de mycoplasmes la plus importante ; en effet, la lactation facilite la multiplication des mycoplasmes dans la mamelle. Les animaux infectés peuvent excréter la bactérie durant plusieurs lactations (Bergonier et al., 1997).

Bien que le diagnostic de certitude repose sur l'examen clinique des animaux suivi de l'isolement de l'agent responsable, la mise en évidence d'anticorps par ELISA est recommandé par l'OIE pour un diagnostic rapide de la présence de la maladie (Kumar et al., 2014). La clinique permet de suspecter l'étiologie mycoplasmique dans un contexte épidémiologique particulier mais la sérologie (ELISA ou autre) permet de dépister les animaux qui ont été en contact avec l'agent, sans préjuger de leur éventuelle contagiosité. Plusieurs kits ELISA pour la recherche d'anticorps spécifiques de l'agalaxie contagieuse sont actuellement commercialisés en France (IDEXX/POURQUIER et LSI) (Groupe de travail «Agalaxie contagieuse dans les Pyrénées-Atlantiques», 2011). La principale technique de diagnostic direct, qui permet la détection des 4 agents étiologiques, est la culture des mycoplasmes à partir d'échantillons de lait. La croissance des mycoplasmes ne se fait que sur des milieux spécifiques et elle est lente (2 à 5 jours) ; il faut également ajouter des antibiotiques auxquels les mycoplasmes ne sont pas sensibles (bétalactamines par exemple) pour inhiber la croissance d'autres bactéries (Becker et al., 2012). Le diagnostic direct repose également sur des techniques de biologie moléculaire : PCR réalisés directement sur le lait ou après culture. Lors de PCR sur lait de mélange, la détection de troupeaux comprenant un très faible nombre d'animaux excréteurs est possible uniquement lorsqu'une étape d'enrichissement par culture est réalisée au préalable. En revanche, lors de PCR sur le lait individuel, l'étape préliminaire de culture n'est pas nécessaire (Groupe de travail «Agalaxie contagieuse dans les Pyrénées-Atlantiques», 2011).

Aujourd'hui, le dépistage sérologique associé à l'éradication des animaux séropositifs reste le meilleur moyen de lutte contre l'agalactie. L'usage des antibiotiques par voie systémique donne des résultats décevants et ne permet pas, dans les conditions mises en œuvre sur le terrain, de garantir la guérison bactériologique. De plus, il a récemment été montré pour *Mycoplasma bovis*, mycoplasme très proche de *Mycoplasma agalactiae*, que la sensibilité pour de nombreux antibiotiques a fortement baissé depuis 30 ans. En effet, une diminution importante de sensibilité a été notée pour les macrolides et les aminosides et une diminution modérée de la sensibilité pour les fluoroquinolones. Pour la classe des phénicolés, en revanche, la sensibilité est restée la même (Gautier-Bouchardon et al., 2014). Les moyens de contrôle de l'agalaxie contagieuse sont lourds et reposent sur deux critères : la détection des animaux infectés et la réduction de la prévalence dans les troupeaux en éliminant les animaux séropositifs (Bergonier et al., 1997) .

Puisqu'il n'y a pas de traitement satisfaisant ni de moyen de contrôle efficace de l'agalaxie contagieuse, les efforts sont portés sur la compréhension de la pathogénie de cette maladie ainsi que sur l'épidémiologie et le mode de transmission dans les troupeaux (Tardy et al., 2012). Récemment, les génomes de 2 souches de *Mycoplasma agalactiae* : la souche type PG2 (la souche type) et la souche 5632 (représentative d'une importante variabilité interspécifique et isolée en 1991 à partir d'articulations de caprins) ont été séquencés et l'évolution de ces 2 souches a été comprise (Sirand-Pugnet et al., 2007; Nouvel et al., 2010). Le génome de la souche 5632 est plus grand que celui de la souche PG2. La différence est due à la présence d'éléments intégratifs conjugatifs (notés ICE) en 3 exemplaires, de séquences d'insertion ainsi qu'un grand nombre de gènes codant pour des protéines de surface chez la souche 5632 (Nouvel et al., 2010)

In vitro, il a été montré que la souche 5632 croît plus rapidement que la souche PG2 (données non publiées). Nous avons donc voulu comparer la colonisation *in vivo* de ces 2 souches inoculées chez des brebis suitées pour ensuite comprendre l'intérêt de ces éléments génétiques sur la pathogénie.

2 Matériels et méthodes

2.1 Animaux

Les expérimentations ont été conduites selon les instructions décrites dans le décret 2013-118 du 1^{er} février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Elles s'inscrivent dans le cadre d'un protocole global de recherche sur *Mycoplasma agalactiae* autorisé par le comité d'éthique de Midi-Pyrénées en décembre 2011.

2.1.1 Choix des animaux

Dans cette étude, nous avons utilisé 6 brebis Causse du Lot croisées Ile de France et leurs 7 agneaux provenant d'un élevage du Lot agréé pour fournir des animaux pour l'expérimentation animale et l'enseignement supérieur.

Les brebis ont été sélectionnées selon plusieurs critères :

- le stade physiologique : brebis allaitantes en début de lactation avec leurs agneaux âgés de 20 jours au début de l'expérimentation (naissance entre le 28 et le 29 octobre 2014) ;
- le statut sérologique (séronégativité par western blot vis-à-vis de *Mycoplasma agalactiae*) ;
- l'état général (absence de symptômes de maladie mammaire ou d'arthrite).

2.1.2 Conduite des animaux

2.1.2.1 Logement

Les animaux ont été hébergés dans un box à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) d'une superficie de 25 m². La litière était constituée de paille accumulée sur du béton.

2.1.2.2 Alimentation

Pendant toute la période expérimentale, les brebis ont reçu du foin *ad libitum* ; distribué deux fois par jour après retrait des refus, dans une mangeoire de 3m de long. Elles recevaient également chacune 250g de concentré matin et soir et avaient un accès à l'eau à volonté.

Les agneaux tétaient leur mère à volonté sauf les 2h précédant le prélèvement de lait. Pendant la dernière semaine de manipulation, ils recevaient également du concentré et avaient accès à l'auge des brebis.

2.1.2.3 Manipulation des animaux lors des prélèvements

Les animaux sont arrivés à l'ENVT le 7 novembre. La première semaine a permis l'acclimation à l'environnement et aux opérateurs. Lors de cette semaine, des prises de sang et un examen clinique ont été réalisés ainsi qu'une tonte autour de la mamelle afin de faciliter les prélèvements de lait sans contamination. Les brebis ont été numérotées de 1 à 6 pour faciliter les manipulations ainsi que les agneaux de 1 à 6 en fonction du numéro de leur mère (voir tableau 1). La brebis 2 avait des jumeaux : numérotés 2a et 2b.

Chaque matin, deux heures avant le prélèvement de lait, les agneaux étaient séparés des brebis et isolés dans un box de 25 m² avec accès à l'eau, foin et concentré. La séparation se faisait dans le calme à l'aide d'une barrière pour éviter l'affolement des brebis.



Photo 1 : Brebis numérotées dans leur box (O. Amblard)

2.2 Inoculum et inoculation

L'inoculum a été composé de 2 souches de *Mycoplasma agalactiae* : la souche 5632 et la souche PG2 (qui est la souche de référence internationale) préalablement titrées et conservées à -80°C. Immédiatement avant l'inoculation, les 2 souches ont été décongelées, diluées et mélangées. Elles ont été administrées, le 17 novembre 2014, dans la même seringue à raison d'1 ml de la souche 5632 à 10⁶ UFC/ml et 1 ml de la souche PG2 à 10⁶ UFC/ml par voie sous-cutanée en avant de l'épaule droite.

2.3 Suivi

2.3.1 Suivi clinique

Pendant toute la durée des expérimentations, les animaux ont été surveillés à chaque distribution de l'alimentation, en particulier pour détecter des boiteries, des mammites cliniques, des signes de douleur ou une baisse d'appétit.

Par ailleurs, deux fois par semaine, lors des prises de sang, un examen clinique complet était réalisé. Une note d'état clinique a été calculée qui prend en compte les paramètres suivants :

- Prise de la température rectale
- Examen de la mamelle : nous déterminions la symétrie des 2 héli-mamelles, la consistance de la mamelle (souple ou dure, homogène ou hétérogène), la température de la mamelle (froide, tiède ou chaude). Nous examinions aussi les trayons et la peau afin de noter la présence de lésions. Enfin, nous palpions les nœuds lymphatiques rétro-mammaires pour déterminer s'ils étaient normaux ou hypertrophiés.
- Examen du lait : un prélèvement de lait nous a permis de déterminer l'aspect du lait ainsi que de détecter une éventuelle agalaxie.
- Examen ophtalmologique : cet examen rapide a permis de détecter une kératite ou une conjonctivite.
- Examen des articulations : il s'agissait de spécifier une boiterie, signe d'arthrite. Si une boiterie était détectée, nous précisions l'articulation atteinte ainsi que l'origine.

Par ailleurs, les agneaux ont été surveillés à chaque séparation des brebis. Il s'agissait en particulier de contrôler les articulations ainsi que l'état général et l'appétit.

2.3.2 Prélèvements

Un plan d'échantillonnage a été mis en place pour un mois.

Pour les brebis, des échantillons de lait des demi-mamelles ont été prélevés tous les jours entre le 17 novembre et le 12 décembre ainsi que le 15 décembre (veille des autopsies). Des prises de sang sont également réalisées deux fois par semaine ; le sang était collecté sur des tubes secs (voir figure 1) puis centrifugé dans la demi-journée. Le sérum était ensuite réparti en fraction alicote.

Les prélèvements de laits ont été effectués dans le calme et de façon aseptique. Ils permettaient de vérifier que chaque brebis ne présentait pas d'agalaxie. Afin de ne pas affoler les animaux, les brebis étaient regroupées à l'aide d'une barrière. Un opérateur contenait l'animal qui était prélevé pour éviter tout mouvement et faciliter la traite. Les trayons étaient désinfectés à l'alcool à 70° et le flacon de prélèvement est stérile. Les opérateurs portaient des gants pour éviter la contamination des échantillons.

Pour les agneaux, des prises de sang (sur tube sec) étaient également réalisées deux fois par semaine.

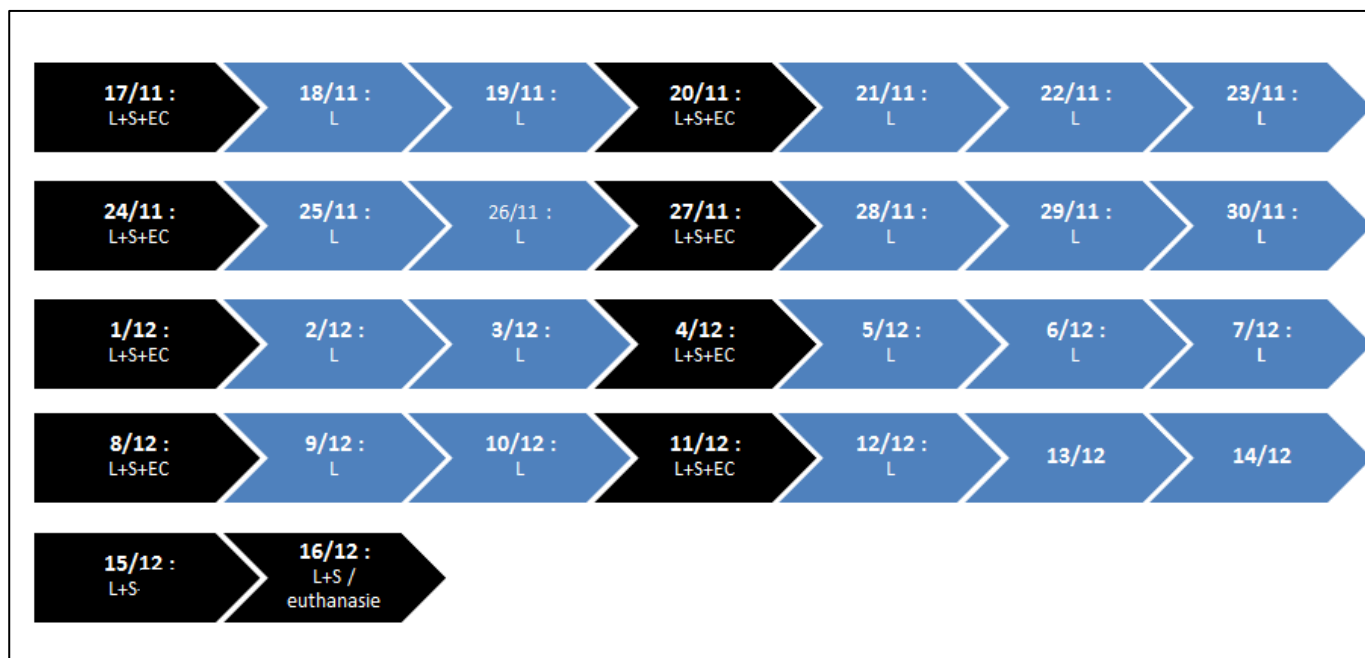


Figure 1 : Plan d'échantillonnage

2.4 Analyses ante-mortem

2.4.1 Analyses du lait

Avant toutes les analyses réalisées sur le lait, des échantillons sont congelés et stockés à -20°C.

2.4.1.1 Bactériologie

Deux types d'examens bactériologiques ont été réalisés. Tout d'abord, nous réalisons une bactériologie classique. Le lait était stocké pendant moins de deux heures à 4°C puis mis en culture sur des géloses au sang. Ces analyses bactériologiques n'ont été réalisées que deux fois par semaine (les lundi et jeudi).

A ces bactériologies classiques s'ajoutaient des bactériologies mycoplasmiques. La première phase était l'enrichissement des prélèvements par ensemencement en milieu liquide spécifique SP4 à des dilutions 1/10 et 1/100 puis incubation à l'étuve 3 jours à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂. La deuxième phase consistait à repiquer les cultures sur un milieu liquide spécifique SP4; placé à l'étuve pendant 4 jours dans les mêmes conditions que l'étape précédente. La dernière phase était l'étalement des cultures sur des géloses mycoplasmes (SP4) et le passage à l'étuve à 37°C pendant 4 jours supplémentaires. Les géloses étaient ensuite examinées sous une loupe binoculaire.

La figure 2 montre les différentes étapes pour les deux bactériologies réalisées sur le lait :

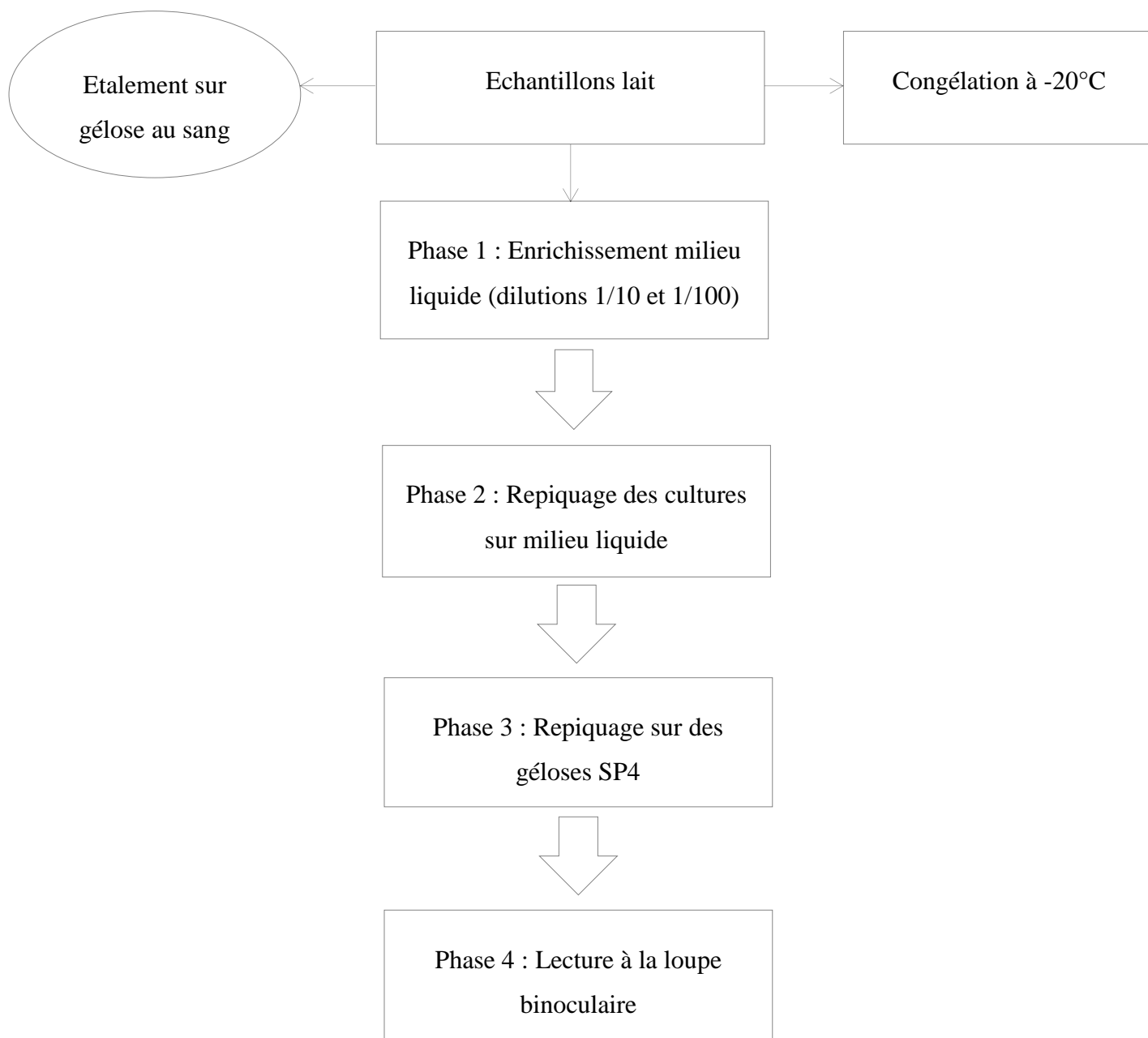
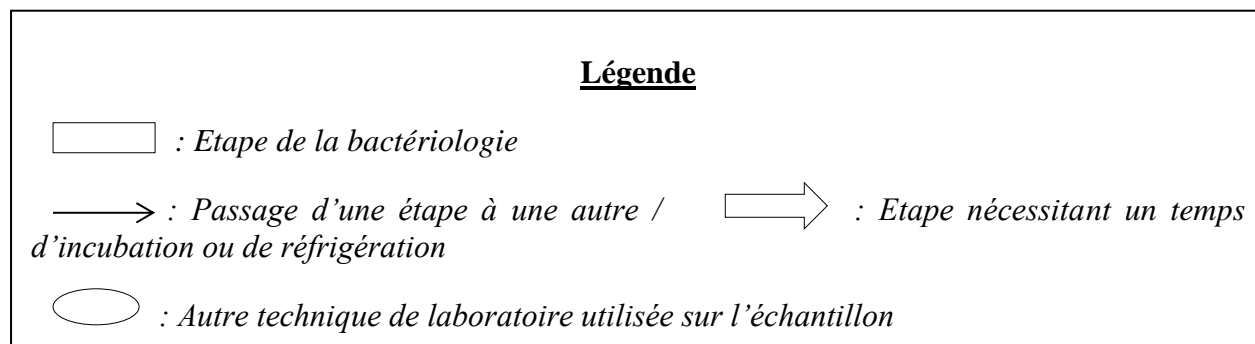


Figure 2 : Schéma expérimental des bactériologies de lait



2.4.1.2 Colony blot

Il était également réalisé des colony blots sur des géloses SP4 quatre fois sur la durée de l'expérimentation (les 21 et 27 novembre puis le 5 et 12 décembre). C'est une méthode de révélation des antigènes de colonies de mycoplasmes.

Au préalable, des colonies ont poussé sur un milieu gélosé dans une boîte de Pétri. Ensuite, une membrane de nitrocellulose était appliquée sur la boîte de Pétri pour permettre le transfert des colonies (pour s'assurer du transfert, la membrane est colorée avec du rouge ponceau). Les membranes étaient ensuite incubées dans une solution tampon contenant 5% de lait écrémé en poudre (Régilait ®). Les membranes étaient utilisées pour la révélation d'anticorps. La première étape était l'incubation des membranes avec un anticorps primaire spécifique. Après lavage, les membranes ont été incubées avec des anticorps secondaires c'est-à-dire des anticorps anti-anticorps primaires.

Les colonies ont finalement été observées à la loupe binoculaire. Sur la figure 3, aucune des cultures faites à partir d'échantillons de lait ne montre la présence d'antigène de *Mycoplasma agalactiae*.

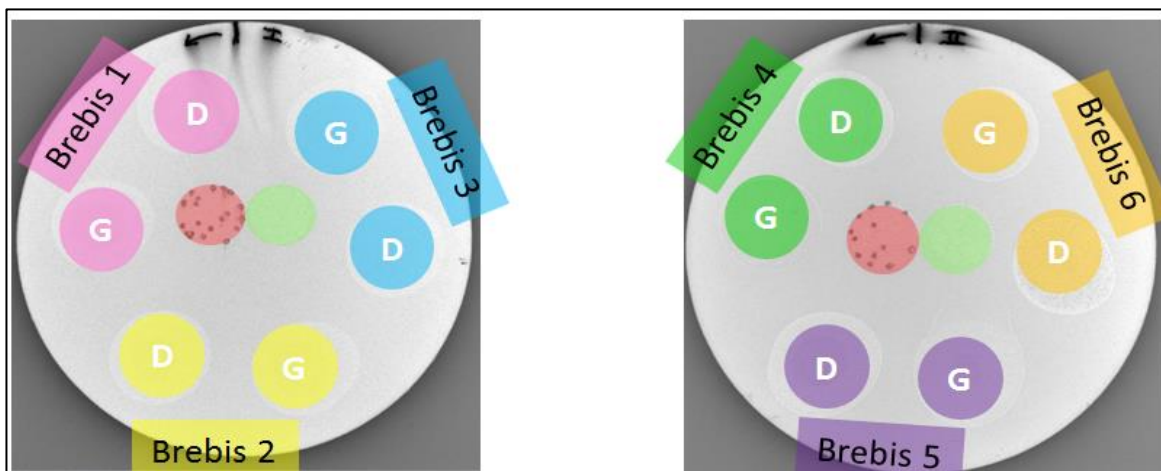




Figure 3 : Plan des Colony Blot

Légende

 : Contrôle +

 : Contrôle –

G / D : Echantillon de lait issu de la demi-mamelle gauche / droite

2.4.1.3 PCR

L'objectif est d'amplifier un fragment d'ADN de *Mycoplasma agalactiae* puis un fragment spécifique à chaque souche.

Le lait était dilué dans un tampon phosphate (PBS) au quart (une partie de lait pour 3 parties de PBS) et au demi (une partie de lait pour une partie de PBS) puis stocké à -20°C. En effet, pour extraire l'ADN il était nécessaire de diluer le lait. Une extraction d'ADN avec le kit QIAGEN (Hilden, Allemagne) était réalisée puis ces échantillons ont été analysés par PCR. Le kit QIAGEN (Hilden, Allemagne) contenait deux tampons (AW1 et AW2). Les échantillons de lait ont été incubés 20 minutes à 56°C avec de la protéinase K puis passés plusieurs fois dans une colonne avec les différents tampons.

Sur le lait, après extraction de l'ADN, nous procédions aux différentes PCR : une pour détecter la présence de mycoplasmes et les 2 autres pour déterminer quelle souche est présente dans le lait. Pour toutes les PCR, le volume du mélange était de 25µL et celui-ci contenait : 1µL de dNTP, 2,5 µL de tampon 10X NEB, 1 µL de chaque amorce, 0,5 µL de Taq polymérase et 1 à 2 µL du milieu de culture et de l'eau.

Deux types de PCR ont ensuite été mises en place (voir tableau 2) :

- Une PCR avec une amorce pour identifier la présence de *Mycoplasma agalactiae* : l'amorce utilisée était la PolC (MaPol-1F et MApol-5R). Le programme était alors le suivant : 1 cycle à 94°C pendant 2 min, 35 cycles avec 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 49°C et 30 secondes à 72°C puis un cycle à 72°C pendant 5 minutes.

- Une PCR pour différencier les deux souches (5632 et PG2) : les amorces utilisées étaient MAG_1570R/F et ORF22-F/R-ICE. Le programme était alors le suivant : 1 cycle à 94°C pendant 2 min, 30 cycles avec 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 72°C puis un cycle à 72°C pendant 5 minutes.

Tableau 1 : Positivité des souches selon l'amorce de la PCR

Amorce	Souche positive
PolC (MaPol-1F et MaPol-5R)	5632 et PG2
MAG_1570F/R	PG2
ORF22-F/R-ICE	5632

Après amplification, les produits issus de la PCR ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose afin de lire et interpréter les résultats. La migration des fragments d'ADN amplifiés varie selon leur taille.

Pour l'électrophorèse, le gel était chargé avec les produits de la PCR ainsi que des témoins positifs et négatifs. Ce gel était immergé dans un tampon et soumis à une tension électrique pendant 30 minutes. Le gel a ensuite été révélé.

La figure 4 récapitule les étapes pour les PCR effectuées sur le lait :

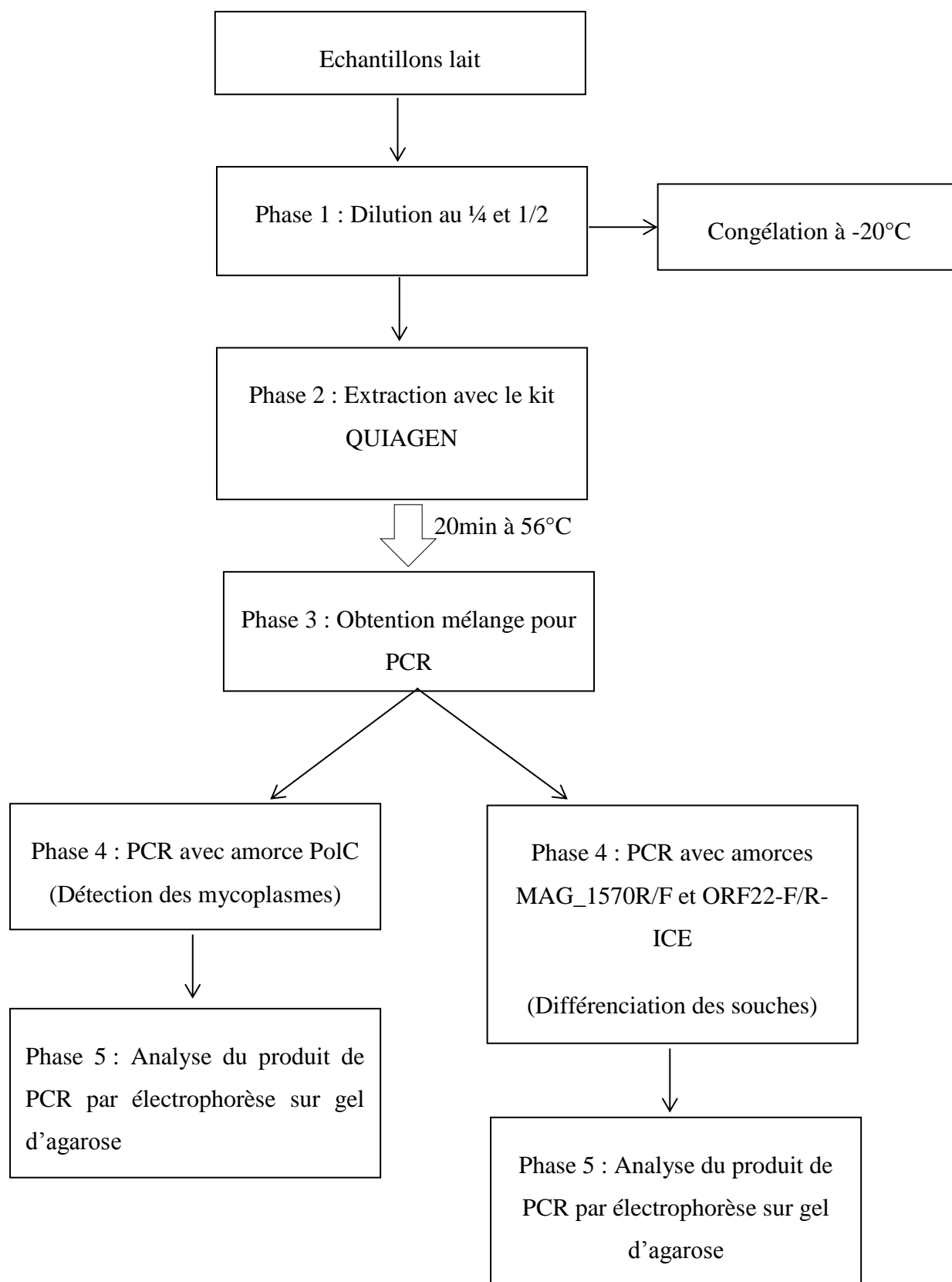


Figure 4 : Schéma expérimental des PCR sur les échantillons de lait

Au début de l'expérimentation, nous avons effectué les PCR tous les 3 jours. Puis afin de ne pas manquer d'excrétion intermittente, nous avons réalisé les PCR sur tous les échantillons de lait. Par ailleurs, la PCR pour détecter la souche n'était effectuée que si la PCR qui détecte les mycoplasmes est positive.

2.4.2 Analyses du sang des brebis et agneaux : western blot

Les sérums ont été stockés à -20°C jusqu'à analyse par Western blot. Les Western Blot ont été effectués le premier jour, jour de l'inoculation et le dernier jour, jour de l'euthanasie. La technique de Western Blot utilisée est celle en vigueur au laboratoire de pathologie de la reproduction de l'ENVT. Après une électrophorèse des échantillons, les protéines séparées ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose pour révélation avec un anticorps. Dans notre cas, nous cherchions à mettre en évidence les anticorps anti-mycoplasmes présents dans le sang. Les Western Blot ont été réalisés pour les 2 souches inoculés.

2.4.3 Calendrier des analyses de laboratoire

Toutes les analyses de laboratoires sont répertoriées dans la frise chronologique suivante (figure 3).

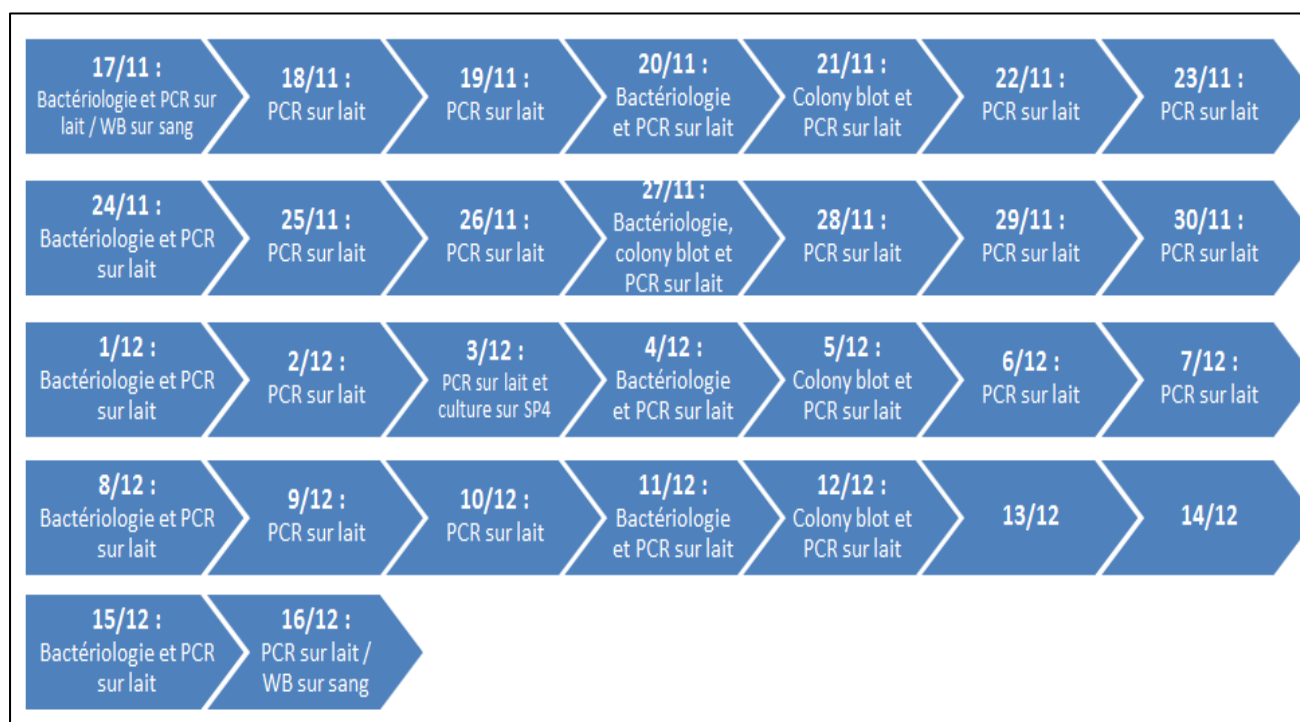


Figure 5 : Calendrier de réalisation des analyses de laboratoire

2.5 Analyses post-mortem

2.5.1 Euthanasie et autopsie

Au terme du suivi, tous les animaux ont été euthanasiés par injection intraveineuse d'une surdose de penthobarbital sodique (140 mg/kg de poids vif ; Euthasol ®).

Pour les agneaux comme pour les brebis, nous avons observé l'état général des animaux, l'état d'embonpoint ainsi que la laine.

Lors de l'autopsie des brebis, nous observions et palpions la mamelle et les articulations à la recherche de mammites ou d'arthrite. Nous examinions les yeux pour repérer d'éventuelles kératites. Nous réalisions également des écouvillons nasaux, auriculaires et conjonctivaux et nous prélevions les nœuds lymphatiques pré-scapulaires, parotidiens et rétro-mammaires.

Pour l'autopsie des agneaux, nous constatons d'éventuelles anomalies des yeux ou des articulations. Des écouvillons nasaux, auriculaires et conjonctivaux ont été réalisés et les nœuds lymphatiques médiastinaux, mésentériques et rétro-mammaires (pour les femelles) ont été prélevés ainsi que les tonsilles.

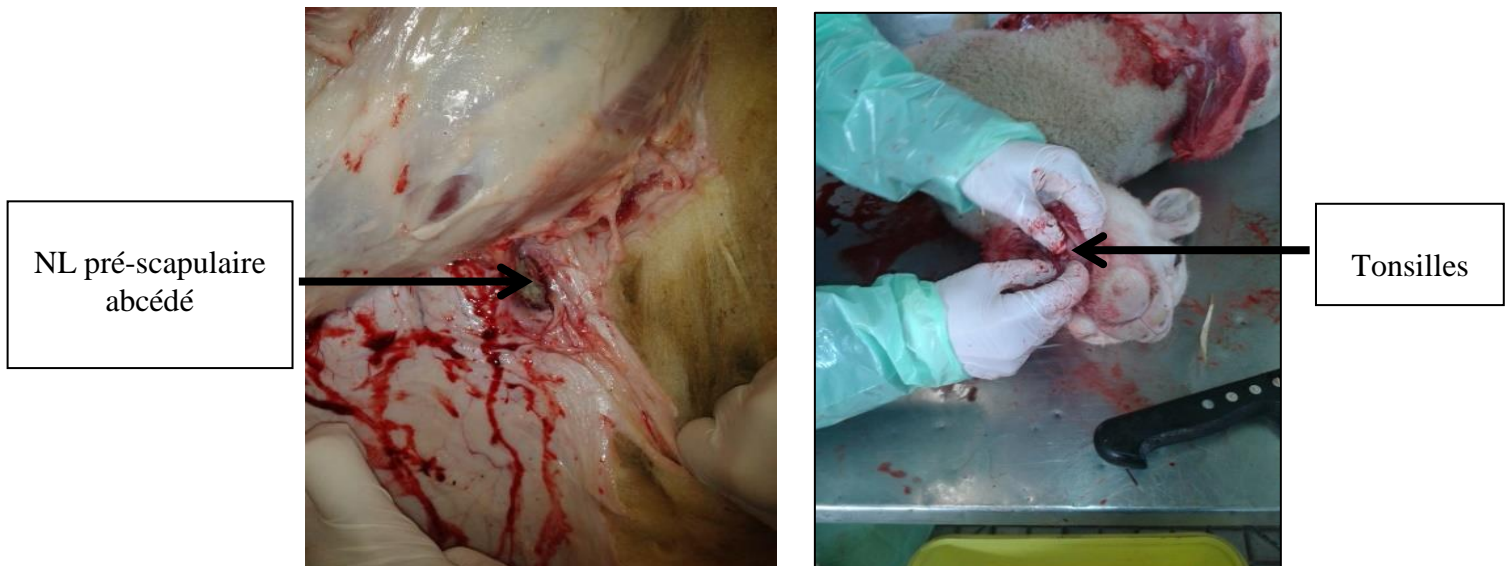
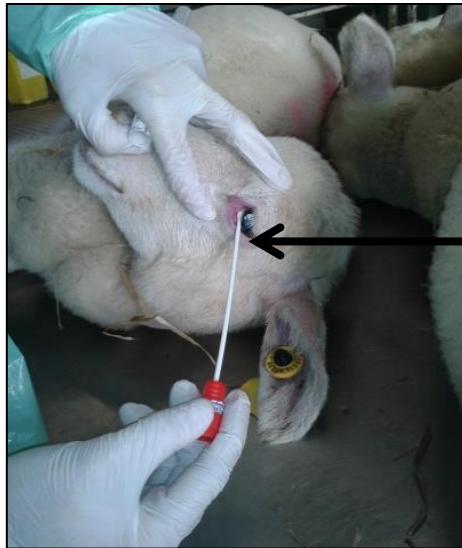


Photo 3 : Nœud lymphatique pré-scapulaire abcédé (O. Amblard)

Photo 2 : Tonsille palatine d'un agneau (O. Amblard)



Ecouvillon sur la cornée et
la conjonctive

Photo 4 : Ecouvillon oculaire (O. Amblard)

2.5.2 Analyses des nœuds lymphatiques

Une partie des nœuds lymphatiques frais ont été mis en culture pour un examen bactériologique et l'autre partie était stockée à -80°C pour ensuite réaliser des PCR. Afin de réaliser la PCR, une extraction d'ADN avec le mini kit QIAamp DNA (QIAGEN) a été effectuée au préalable.

2.5.2.1 Bactériologie

Tous les nœuds lymphatiques prélevés ont été mis en culture selon le protocole en vigueur au laboratoire.

2.5.2.2 PCR

Une PCR a été réalisée directement sur des broyats de nœuds lymphatiques après extraction de l'ADN. Après culture des nœuds lymphatiques, une seconde PCR a été effectuée.

L'extraction de l'ADN s'est faite à l'aide du kit QIAamp DNA Mini kit. Il contenait quatre tampons (AL Lysis, ATL Tissue Lysis, AW1 Wash Buffer, AW2 Wash Buffer 2). Des échantillons de 25mg de tissus ont été incubés 20 minutes à 56°C avec de la protéinase K et du tampon ATL. Les échantillons ainsi obtenus ont ensuite été passés plusieurs fois dans une colonne avec les différents tampons.

Comme pour le lait, 2 types de PCR ont été mises en place :

- Une PCR avec l'amorce PolC pour identifier la présence de *Mycoplasma agalactiae*
- Une PCR avec des amorces spécifiques permettant de différencier les 2 souches : 5632 et PG2

Après amplification, les produits issus de la PCR ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. La technique utilisée était la même que celle pour les échantillons de lait.

La figure 6 montre les étapes d'analyses des nœuds lymphatiques :

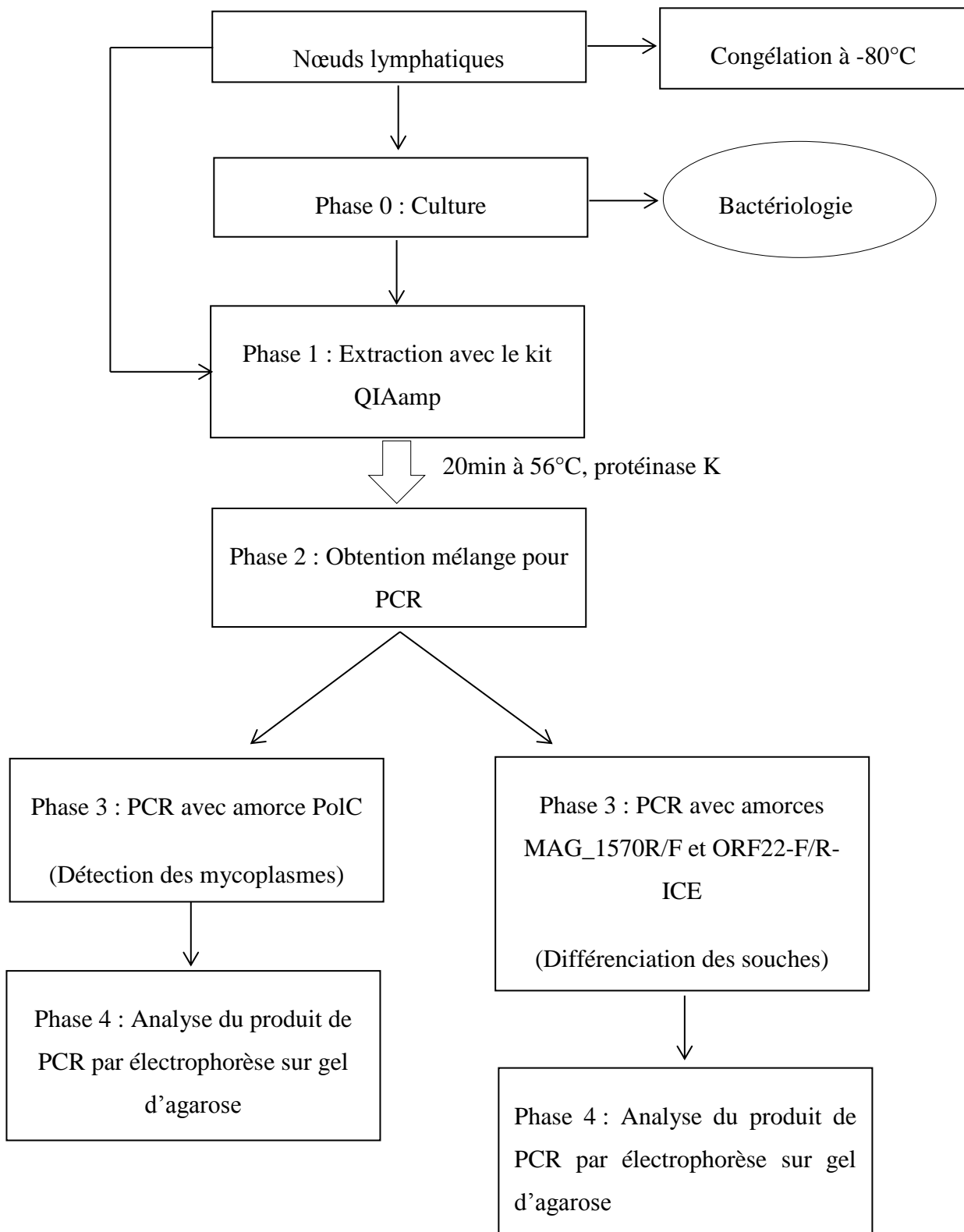


Figure 6 : Schéma expérimental des analyses des nœuds lymphatiques

2.5.3 Analyses des écouvillons

Une extraction d'ADN était réalisée au préalable. Les écouvillons ont été placés dans des tubes contenant 0,5mL de tampon de lyse (100mM Tris-HcL, pH 8,5, 0,05% Tween 20 et 0,24mg/mL protéinase K) et agités pendant 1 minute. Les tubes ont été laissés 60 minutes à 60°C puis 15 minutes à 97°C (Vilei et al. 2007).

Les 2 types de PCR ont ensuite été réalisés sur les échantillons obtenus comme pour les nœuds lymphatiques et le lait ainsi que des électrophorèses.

Les écouvillons ont ensuite été stockés à -20°C.

3 Résultats

3.1 Suivi

3.1.1 Suivi clinique

Le suivi clinique reposait sur des observations journalières ainsi que des examens cliniques complets deux fois par semaine (voir tableau 2).

Tableau 2: Examen clinique des brebis

Brebis	Brebis 1	Brebis 2	Brebis 3	Brebis 4	Brebis 5	Brebis 6
Température rectale moyenne en °C	39,4	39,5	39,4	39,3	39,4	39,6
Symétrie de la mamelle	N	N	N	Légère asymétrie à G les 27 novembre, le 5 et 8 décembre	Légère asymétrie à D le 21 novembre	Légère asymétrie à D le 21 novembre puis à partir du 1er décembre
Consistance de la mamelle	Homogène Souple	Homogène Souple	Homogène Souple	Homogène Souple	Homogène Souple	Homogène Souple
Température de la mamelle	N	N	N	N	N	N
Lésions peau/ trayon	N	Ecthyma D et G à partir du 21 novembre	N	Abcès trayon G à partir du 8 décembre	N	Abcès cutané du 17 au 21 novembre Ecthyma G à partir du 5 décembre
Nœud lymphatique rétro-mammaire	N	D = réactionnel à partir du 5 décembre G = N	D : réactionnel tout au long de l'expérimentation G : N	G : Réactionnel à partir du 5 décembre D : N	N	Réactionnels (G : taille mandarine et D : taille noix)
Lait	N	N	N	Hypogalaxie dès le 1er décembre	N	N
Boiterie	N	Piétin antérieur D jusqu'au 24 novembre	N	N	N	N
Signes oculaires	N	N	N	N	N	N

Légende

D : droite / G : gauche

N : normal (symétrie des 2 héli-mamelles, mamelle tiède, pas d'anomalie de la peau et des trayons, pas d'hypogalaxie ou d'agalaxie, pas de boiterie ni de signes oculaires)

Homogène : pas d'induration locale / hétérogène : points d'induration locaux

Souple : pas induré ni complètement molle

Réactionnel : NL induré, hypertrophié

Les brebis 1 et 5 n'ont montré aucun signe clinique tout au long du suivi. Cependant la brebis 5 a présenté un abcès à l'épaule droite, lieu d'inoculation. Nous avons traité la douleur par l'administration d'acide tolfénamique (Tolfine®) à la dose de 2mg/kg par jour pendant trois jours. Les brebis 2 et 3 ont présenté des signes cliniques mais n'ont pas pu être mis en relation avec l'agalaxie contagieuse.

La brebis 4 a présenté une hypogalaxie à gauche entre le 27 novembre et le 8 décembre ainsi qu'une hypertrophie du nœud lymphatique gauche entre le 5 et le 11 décembre.

En ce qui concerne la température rectale des brebis, les brebis 1, 3, 4 et 5 n'ont pas eu d'élévation au-dessus de 40°C tout au long de l'expérimentation. La brebis 2 était en hyperthermie (40°C) le 7^{ème} jour.

La brebis 6 a présenté dès le 1^{er} jour un abcès cutané sur l'hémi-mamelle droite qui est devenu caséux le 21 novembre. Nous avons débridé l'abcès et traité la douleur par l'administration d'acide tolfénamique (Tolfine®) à la dose de 2mg/kg par jour pendant 3 jours. Dès le 21 novembre, elle a présenté une légère asymétrie de la mamelle à droite plus ou moins marquée mais qui a duré jusqu'au dernier examen clinique. Les 2 nœuds lymphatiques rétro-mammaires ont été réactionnels à partir du 21 novembre : le nœud lymphatique gauche mesurait la taille d'une mandarine et le droit celle d'une noix. (cf Annexe : tableaux du suivi clinique). Par ailleurs, nous avons noté une élévation de la température moyenne au-dessus de 39,5°C pour la brebis 6 avec 2 pics d'hyperthermie (à J4 et J7) au-dessus de 40°C. Sur le graphe suivant, nous avons représenté la courbe de température de la brebis 6 ainsi que de la brebis 1 (représentative des toutes les brebis n'ayant pas eu de pic d'hyperthermie). Les courbes de toutes les brebis sont en annexe 2.

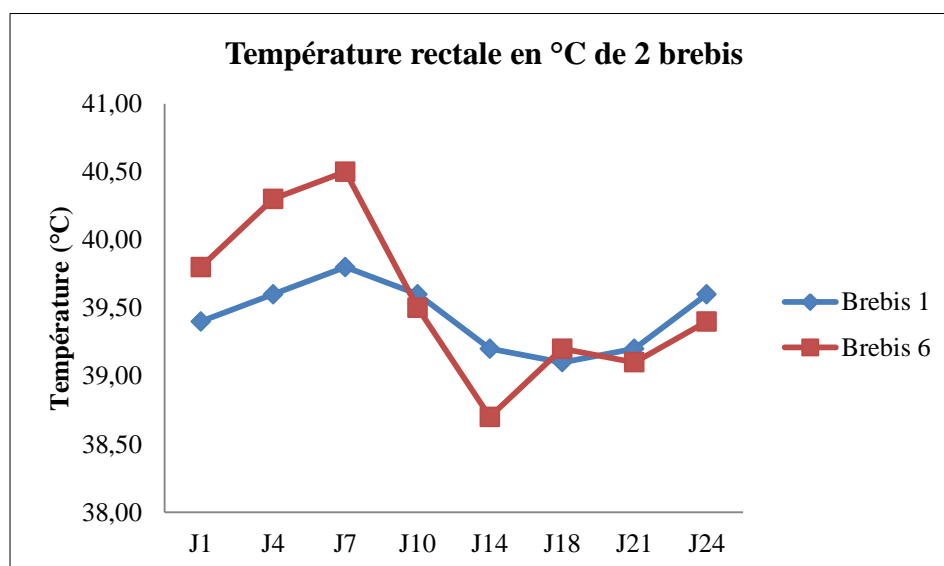


Figure 7: Courbes des températures au cours des examens cliniques

Les agneaux, quant à eux, n'ont montré aucun signe clinique tout au long de l'expérimentation.

3.1.2 Analyses du lait

3.1.2.1 Bactériologie

Pour les brebis 1,3 et 5, les cultures bactériologiques du lait ont été négatives ou souillées (colonies polymicrobiennes) pour les 2 héli-mamelles. Le lait de la brebis 2 présentait dès le jour d'inoculation des colonies de Streptocoques coagulase négative pour l'héli-mamelle droite.

Pour la brebis 4, les cultures de lait de la mamelle droite ont été négatives ou souillées. En revanche, pour la mamelle gauche, nous avons noté la présence d'hémolyse sans colonie entre le 24 novembre et le 4 décembre.

Nous notions la présence de colonies de staphylocoques coagulase négative dans le lait de la brebis 6 à gauche le 27 novembre et le 1^{er} décembre. A droite, la culture du lait a montré une hémolyse sans colonie à partir du 27 novembre.

Le tableau 3 présente les résultats des bactériologies réalisées sur le lait.

Tableau 3 : Résultats des analyses bactériologiques classiques sur le lait frais des brebis

Date		17/11/2014	20/11/2014	24/11/2014	27/11/2014
Brebis	Hémi-mamelle				
Brebis 1	D	0	0	0	0
	G	0	0	souillé	0
Brebis 2	D	SCN	SCN	SCN	SCN
	G	0	0	0	souillé
Brebis 3	D	0	0	0	0
	G	0	0	souillé	0
Brebis 4	D	0	0	0	0
	G	0	0	Hémolyse sans colonie	Hémolyse sans colonie
Brebis 5	D	0	0	0	souillé
	G	0	0	0	souillé
Brebis 6	D	0	0	souillé	Hémolyse sans colonie
	G	0	0	0	SCN

Date		01/12/2014	04/12/2014	11/12/2014	15/12/2014
Brebis	Hémi-mamelle				
Brebis 1	D	0	0	0	0
	G	0	0	0	0
Brebis 2	D	SCN	SCN	SCN	SCN
	G	0	souillé	souillé	0
Brebis 3	D	0	souillé	0	0
	G	0	0	0	souillé
Brebis 4	D	0	souillé	0	0
	G	Hémolyse sans colonie	Hémolyse sans colonie	0	0
Brebis 5	D	0	0	0	souillé
	G	0	0	0	souillé
Brebis 6	D	Hémolyse sans colonie	Hémolyse sans colonie	Hémolyse sans colonie	Hémolyse sans colonie
	G	SCN	souillé	0	0

Légende

D : hémi-mamelle droite / G : hémi-mamelle gauche

0 : pas de colonies visibles

SCN : Staphylocoque coagulase négative / Souillé : polymicrobien

Hémolyse sans colonies : hémolyse de la gélose mais de colonies présentes lors de la lecture des géloses (moins d'une semaine après l'ensemencement)

3.1.2.2 Colony blot

Le 21 novembre, aucune colonie n'a été mise en évidence dans le lait des brebis.

Le 27 novembre, nous avons noté la présence de la souche PG2 pour le lait de l'hémi-mamelle gauche de la brebis 4 et la droite de la brebis 6. Pour la dilution au dixième, nous avons compté plus de 500 colonies pour la brebis 6 à droite et vu une nappe pour la brebis 4 à gauche. Pour la dilution au centième, les colonies étaient indénombrables pour la brebis 4 et 108 colonies ont été comptées pour la brebis 6.

Le 5 décembre, les Colony blot étaient positifs pour les 2 hémi-mamelles de la brebis 4 et l'hémi-mamelle droite de la brebis 6 ; c'est la souche PG2 qui a été mise en évidence. Pour la dilution au centième, nous avons vu des nappes pour les hémi-mamelles droite de la brebis 6 et gauche de la brebis 4 ainsi que 25 colonies pour l'hémi-mamelle droite de l'animal 4. Pour la dilution au centième, nous avons compté 3 colonies à droite pour la brebis 4 et toujours de nombreuses colonies pour les 2 autres.

Le 12 novembre, nous avons retrouvé la souche PG2 pour le lait de l'hémi-mamelle gauche de la brebis 4 (présence douteuse) et la droite de la brebis 6. Pour la mamelle gauche de la brebis 4, plus ou moins 3 colonies ont été comptées à la dilution au centième mais aucune n'a été retrouvée au millièm. Pour la mamelle droite de la brebis 6, nous avons vu une nappe à la dilution au centième et compté 60 colonies au millièm.

Tableau 4: Résultats des Colony Blot sur le lait des brebis

Date	Dilution lait	Révélation	Brebis/côté positif	Nombre de colonie	PG2	5632
21/11/2014	1/10 ème	fluorescéine	Négatif	0	-	-
					-	-
	1/100 ème	fluorescéine	Négatif	0	-	-
					-	-
27/11/2014	1/10 ème	péroxydase	4G	Nappe	+	-
			6D	>500 colonies	+	-
	1/100 ème	péroxydase	4G	Indénombrable	+	-
			6D	108 colonies	+	-
05/12/2014	1/100 ème	péroxydase	4D	25 colonies	+	-
			4G	Nappe	+	-
			6D	Nappe	+	-
	1/1000 ème	péroxydase	4D	3 colonies	+	-
			4G	Indénombrable	+	-
			6D	Nappe	+	-
12/12/2014	1/100 ème	péroxydase	4G	3 colonies ?	"+"	-
			6D	Nappe	+	-
	1/1000 ème	péroxydase	4G	0	-	-
			6D	60 colonies	+	-

Légende

G : hémi-mamelle gauche : D : hémi-mamelle droite

4 ou 6 : numéro de la brebis

+ : positif pour une souche donnée

Nappe : nombreuses colonies mais non discernables les unes des autres

Indénombrable : colonies trop nombreuses pour être comptées

3.1.2.3 PCR

Les brebis 4 et 6 étaient positives de façon constante à partir du septième jour (le 24 novembre 2014). Les PCR montraient que la souche présente était la PG2. Seule une demi-mamelle excréta *Mycoplasma agalactiae* pour chaque brebis sur toute la durée de l'expérimentation. Le côté gauche pour la brebis 4 et le côté droit pour la brebis 6. Mais le côté droit de la brebis 4 était légèrement positif pour la PG2 le 27 novembre puis du 4 au 6 décembre.

Tableau 5 : Résultats des PCR sur le lait

Brebis	Résultats
1	Négatif
2	Négatif
3	Négatif
4	Positif à G (PG2) du 24 novembre au 15 décembre Positif faible à D (PG2) le 27 novembre et du 4 au 6 décembre
5	Négatif
6	Positif à D (PG2) du 24 novembre au 15 décembre

Légende

1-6 : Numéro de la brebis

G : Héli-mamelle gauche

D : Héli-mamelle droite

Positif : PCR montre la présence d'une souche de mycoplasme

Négatif : Mycoplasme n'est pas excrété dans le lait

3.1.3 Analyses du sang des brebis et agneaux : western blot

Toutes les brebis présentaient des anticorps contre *Mycoplasma agalactiae* pour les 2 souches inoculées. Cependant, la présence était plus marquée pour certaines brebis (brebis n°1, 4 et 6) que d'autres (brebis n°3) (cf. figure 4 et 5).

En revanche les agneaux ne semblaient pas avoir d'anticorps anti-mycoplasmes. Cependant, les Western Blot des agneaux 2 et 5 étaient douteux pour la souche PG2 (cf. figure 4 et 5).

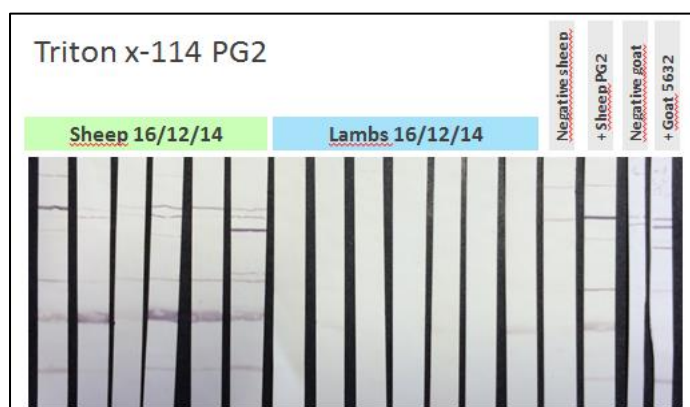


Figure 9: Résultats du western blot pour la souche PG2

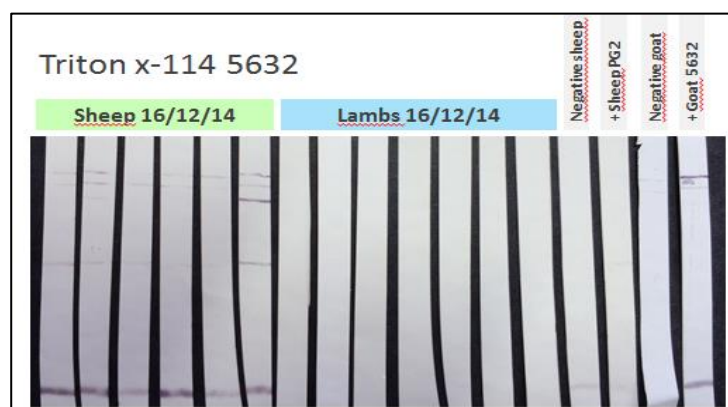


Figure 9 : Résultats Western Blot pour la souche 5632

Légende

Sheep : Brebis de 1 à 6, sang prélevé le dernier jour de l'étude

Lamb : agneaux, sang prélevé le dernier jour de l'étude

Negative sheep : Contrôle négatif (brebis)

Negative goat : Contrôle négatif (chèvre)

+ *sheep PG2* : Contrôle positif pour la souche PG2

+ *goat 5632* : Contrôle positif pour la souche 5632

3.2 Post-mortem

3.2.1 Autopsies

3.2.1.1 Etat général

Les brebis ainsi que les agneaux étaient en très bon état général. En effet, les agneaux ne semblaient pas amaigris.

3.2.1.2 Articulations et mamelles

Toutes les articulations semblaient normales à la palpation-pression. Aucune boiterie n'avait été détectée lors des examens cliniques.

Les mamelles étaient normales à la palpation excepté les asymétries remarquées lors des examens cliniques. Nous ne notions pas d'induration marquée ni signe de mammite, le lait était de consistance normal. Aucune coupe de mamelle n'a été réalisée.

3.2.1.3 Nœuds lymphatiques

Lors des autopsies, nous prélevons les nœuds lymphatiques des brebis et nous décrivons ensuite leur aspect macroscopique (voir tableau 6).

Tableau 6 : Description des nœuds lymphatiques des brebis

Brebis	1	2	3	4	5	6
NL rétro-mammaire droit	N	N	Hypertrophié pus blanc-jaunâtre	N	N	Hypertrophié et hémorragique, nodules dans la corticale
NL rétro-mammaire gauche	N	N	N	N	N	Très hypertrophié, pus, crisse à la coupe et perte de structure cortico-médullaire
Pré-scapulaire	Hémorragiques avec du pus blanc jaunâtre	Kyste caséux	Hémorragique avec kystes caséux	Hypertrophié, hémorragique avec pus caséux	Hypertrophiés, hémorragiques	Hypertrophiés, hémorragiques
Parotidien	N	Aspect très modifié (pas de jonction cortico- médullaire)	D : hémorragique G : couleur blanche et dure	Hémorragiques	Hémorragiques	D : hypertrophié avec kyste caséux G : petit kyste caséux

Légende

NL : nœud lymphatique

N : nœud lymphatique d'aspect macroscopique normal

D : droit / G : gauche

A l'autopsie, toutes les brebis avaient une réaction importante des nœuds lymphatiques proches du point d'injection et présentaient parfois un abcès en avant de l'épaule droite. Les nœuds lymphatiques pré-scapulaires droits étaient très réactifs voire abcédés dans certains cas (pour les brebis 3,4 et 5). De même, les nœuds lymphatiques parotidiens étaient très réactionnels sauf chez la brebis 1.

Nous avons également pu noter une adénomégalie généralisée pour la brebis 6 ; c'est le premier animal qui a excrété les mycoplasmes dans le lait. Un déséquilibre de la mamelle ainsi qu'une hypertrophie des nœuds lymphatiques rétro-mammaire ont été notés lors des examens cliniques.

La brebis 4 a également excrété une des souches de mycoplasmes mais à l'autopsie les nœuds lymphatiques rétro-mammaires étaient normaux.

Nous prélevons et décrivons également les nœuds lymphatiques des agneaux.

Tableau 7 : Description macroscopique des nœuds lymphatiques des agneaux

Agneaux	1	2a	2b	3	4	5	6
Tonsilles	N	N	Hémorragique	N	N	N	N
NL mésentérique	N	N	N	N	N	Hémorragique	N
NL médiastinal	N	N	N	N	Hémorragiques Pas de structure cortico- médullaire	Hémorragiques jonction cortico- médullaire difficile à voir	Hémorragiques
NL rétro- mammaire	Hémorragique	N	-	N	-	Hémorragiques	Hémorragiques

Légende

NL : nœud lymphatique

N : nœud lymphatique d'aspect macroscopique normal

D : droit / G : gauche

- : pas de NL rétro-mammaire car agneau mâle

Tous les nœuds lymphatiques des agneaux 2a et 3 étaient normaux. Les nœuds lymphatiques rétro-mammaires de l'agneau 1 étaient hémorragiques. Les tonsilles de l'agneau 2b étaient hémorragiques.

Les nœuds lymphatiques médiastinaux des agneaux 4 et 5 étaient hémorragiques et nous notions une perte de la structure cortico-médullaire. Les nœuds lymphatiques mésentériques et rétro-mammaires de l'agneau 5 étaient également hémorragiques.

L'agneau 6 présentait des nœuds lymphatiques mésentériques et rétro-mammaires hémorragiques.

3.2.2 Analyses des nœuds lymphatiques

3.2.2.1 Bactériologie classique

Lors de la mise en culture des nœuds lymphatiques des brebis, il y avait croissance de colonies pour tous les nœuds lymphatiques pré-scapulaires : certaines cultures étaient souillées.

Pour les nœuds lymphatiques rétro-mammaires gauche de la brebis 4 et droit de la brebis G, la mise en culture a montré également la croissance de colonies bactériennes.

Tableau 8 : Résultats des cultures sur les organes des brebis

Brebis	1	2	3	4	5	6
Retro-mammaire G	-	-	-	+	-	-
Retro-mammaire D	-	-	-	-	-	+
Préscapulaire	+	+	souillé	souillé	souillé	+

Légende

D : droit / G : gauche

- : absence de colonie

+ : présence d'une colonie

Souillé : présence de plusieurs colonies (polymicrobien)

Lors de la mise en culture des tonsilles des agneaux, il y avait croissance de colonies pour tous les animaux. Mais dans la plupart des cas (agneaux 1,2b, 3, 4 et 5 soit cinq agneaux sur les sept), les cultures étaient souillées.

Tableau 9 : Résultats des cultures sur organes des agneaux

Agneaux	1	2a	2b	3	4	5	6
Tonsilles	souillé	+	souillé	souillé	souillé	souillé	+

Légende

D : droit / G : gauche

- : absence de colonie

+ : présence d'une colonie

Souillé : présence de plusieurs colonies (polymicrobien)

3.2.2.2 PCR

Lors des PCR réalisées directement sur les organes frais, la présence de mycoplasmes a été mise en évidence dans les nœuds lymphatiques pré-scapulaires des brebis 1, 4 et 6, en particulier la souche 5632. .

Tableau 10 : Résultats PCR directes sur les nœuds lymphatiques de brebis

Brebis	Souche	1	2	3	4	5	6
Retro-mammaire G	Mycoplasme	-	-	-	-	-	-
	PG2	-	-	-	-	-	-
	5632	-	-	-	-	-	-
Retro-mammaire D	Mycoplasme	-	-	-	-	-	-
	PG2	-	-	-	-	-	-
	5632	-	-	-	-	-	-
Préscapulaire	Mycoplasme	+	-	-	+	-	-
	PG2	-	-	-	-	-	-
	5632	+	-	-	+	-	+
Parotidien	Mycoplasme	-	-	-	(+)	-	-
	PG2	-	-	-	-	-	-
	5632	-	-	-	+	-	-

Légende

D : droit / G : gauche

- : Absence d'ADN de mycoplasme ou d'une des 2 souches testées (PG2/5632)

+ : Présence d'ADN de mycoplasme ou d'une des 2 souches testées (PG2/5632)



: Présence de mycoplasme



: Présence de la souche 5632

Lors des PCR réalisées après culture, les mycoplasmes étaient présents dans tous les nœuds lymphatiques pré-scapulaires des brebis. La souche 5632 a été mise en évidence chez tous les individus et la souche PG2 était également présente dans le nœud lymphatique pré-scapulaire de la brebis 5.

Par ailleurs, les deux nœuds lymphatiques rétro-mammaires de la brebis 4 ainsi que le nœud lymphatique rétro-mammaire droit de la brebis 6 présentaient des mycoplasmes de la souche PG2. Les brebis 4 et 6 étaient les seules à avoir excrété les mycoplasmes dans le lait et à avoir montré des signes cliniques d'adénomégalie voire d'agalaxie. Il a également été montré la présence de mycoplasmes (la souche est inconnue) dans le nœud lymphatique parotidien de la brebis 4.

Tableau 11 : Résultats PCR après culture sur les nœuds lymphatiques de brebis


Brebis	Souche	1	2	3	4	5	6
Retro-mammaire G	Mycoplasme	-	-	-	+	-	-
	PG2	-	-	-	+	-	-
	5632	-	-	-	-	-	-
Retro-mammaire D	Mycoplasme	-	-	-	+	-	+
	PG2	-	-	-	+	-	+
	5632	-	-	-	-	-	-
Pré-scapulaire	Mycoplasme	+	+	+	+	+	+
	PG2	-	-	-	-	+	-
	5632	+	+	+	+	+	+
Parotidien	Mycoplasme	-	-	-	+	-	-
	PG2	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	5632	NE	NE	NE	NE	NE	NE


Légende

D : droit / G : gauche

- : Absence d'ADN de mycoplasme ou d'une des 2 souches testées (PG2/5632)

+: Présence d'ADN de mycoplasme ou d'une des 2 souches testées (PG2/5632)

 : Présence de mycoplasme

 : Présence de la souche 5632

 : Présence de la souche PG2

Lors des PCR réalisées directement sur les organes, la souche PG2 a été mise en évidence dans les tonsilles des agneaux 2a, 4 et 6. Tous les autres nœuds lymphatiques ne présentaient pas de mycoplasme.

Tableau 12 : Résultats PCR directes sur les nœuds lymphatiques des agneaux


Agneaux	Souche	1	2a	2b	3	4	5	6
Tonsilles	Mycoplasme	-	+	-	-	+	-	+
	PG2	-	+	-	-	+	-	+
	5632	-	-	-	-	-	-	-
Mésentériques	Mycoplasme	-	-	-	-	-	-	-
	PG2	-	-	-	-	-	-	-
	5632	-	-	-	-	-	-	-
Médiastinaux	Mycoplasme	-	-	-	-	-	-	-
	PG2	-	-	-	-	-	-	-
	5632	-	-	-	-	-	-	-
Rétro-mammaires	Mycoplasme	-	-	/	-	/	-	-
	PG2	-	-	/	-	/	-	-
	5632	-	-	/	-	/	-	-


Légende

D : droit / G : gauche

- : Absence d'ADN de mycoplasme ou d'une des 2 souches testées (PG2/5632)

+ : Présence d'ADN de mycoplasme ou d'une des 2 souches testées (PG2/5632)

 : Présence de mycoplasme

 : Présence de la souche 5632

 : Présence de la souche PG2

/ : pas de NL car agneau mâle

Lors des PCR réalisées après culture, les résultats précédents ont été confirmés mais le tonsille de l'agneau 3 présentait également des mycoplasmes de la souche PG2.

Tableau 13 : Résultats PCR après culture sur les nœuds lymphatiques des agneaux


Agneaux	Souche	1	2a	2b	3	4	5	6
Tonsilles	Mycoplasme	-	+	-	+	+	-	+
	PG2	-	+	-	+	+	-	+
	5632	-	-	-	-	-	-	-
Mésentériques	Mycoplasme	-	-	-	-	-	-	-
	PG2	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	5632	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Médiastinaux	Mycoplasme	-	-	-	-	-	-	-
	PG2	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	5632	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE


Légende

D : droit / G : gauche

- : Absence d'ADN de mycoplasme ou d'une des 2 souches testées (PG2/5632)

+ : Présence d'ADN de mycoplasme ou d'une des 2 souches testées (PG2/5632)

 : Présence de mycoplasme

 : Présence de la souche PG2

NE : Non évalué

3.2.3 Analyses des écouvillons

Pour la brebis 4, l'écouvillon nasal a montré la présence de mycoplasmes de souche PG2. Pour la brebis 1, l'écouvillon oculaire était positif lors de la PCR avec la Pol C mais aucune des PCR pour les souches n'était positive (malgré un doute pour la souche 5632).

Tableau 14 : Résultats des PCR sur les écouvillons des brebis

Brebis	Souche	1	2	3	4	5	6
Ecouvillon oculaire	Mycoplasme	-	+	-	-	-	-
	PG2	-	-	-	-	-	-
	5632	-	(+)	-	-	-	-
Ecouvillon nasal	Mycoplasme	-	-	-	+	-	-
	PG2	-	-	-	+	-	-
	5632	-	-	-	-	-	-
Ecouvillon auriculaire	Mycoplasme	-	-	-	-	-	-
	PG2	-	-	-	-	-	-
	5632	-	-	-	-	-	-

Légende

- : Absence d'ADN de mycoplasme ou d'une des 2 souches testées (PG2/5632)

+ : Présence d'ADN de mycoplasme ou d'une des 2 souches testées (PG2/5632)



: Présence de mycoplasme



: Présence de la souche 5632



: Présence de la souche PG2

Pour l'agneau 4, l'écouvillon auriculaire était positif pour la 5632. Pour les agneaux 3 et 4, les écouvillons nasaux étaient positifs avec la PCR qui détecte les mycoplasmes mais aucune des PCR qui détectent les souches n'étaient positives. De même, pour l'écouvillon auriculaire de l'agneau 2a.

Tableau 15 : Résultats de PCR sur les écouvillons des agneaux

Agneaux	Souche	1	2a	2b	3	4	5	6
Ecouvillon oculaire	Mycoplasme	-	-	-	-	-	-	-
	PG2	-	-	-	-	-	-	-
	5632	-	-	-	-	-	-	-
Ecouvillon nasal	Mycoplasme	-	-	-	+	+	-	-
	PG2	-	-	-	-	-	-	-
	5632	-	-	-	-	-	-	-
Ecouvillon auriculaire	Mycoplasme	-	+	-	-	+	-	-
	PG2	-	-	-	-	-	-	-
	5632	-	-	-	-	+	-	-

Légende

- : Absence d'ADN de mycoplasme ou d'une des 2 souches testées (PG2/5632)

+ : Présence d'ADN de mycoplasme ou d'une des 2 souches testées (PG2/5632)



: Présence de mycoplasme



: Présence de la souche 5632



: Présence de la souche PG2

4 Discussion

4.1 Discussion du matériel et méthodes

4.1.1 Choix des animaux

4.1.1.1 Race

Dans notre étude, les brebis utilisées sont des croisements entre une race rustique (Causse du Lot) et une race à viande (Ile de France). Elles sont issues d'un élevage du Lot qui est une zone indemne d'agalaxie contagieuse. Les brebis Causse du Lot sont douées de qualités maternelles et d'une forte prolificité ; ce sont également des animaux dociles. L'intérêt, dans notre étude, est d'avoir une production laitière suffisante pour repérer les signes mammaires mais aussi d'avoir des animaux calmes lors des expérimentations (« Les Races de Massif - CORAM - Collectif des Races locales des Massifs (ovins, bovins) », s. d.). Ces brebis sont croisées avec des béliers de race Ile de France. Cette race, destinée à la production de viande allie également de nombreuses qualités dont une bonne prolificité et une bonne valeur laitière. Ces critères sont intéressants dans le cadre de notre étude. Ils permettent d'avoir des signes cliniques probablement plus marqués. Par ailleurs, la prolificité importante des 2 races est également utile dans le cadre de nos expérimentations puisque nous voulons suivre l'infection naturelle des agneaux et mettre en évidence d'éventuels signes d'agalaxie contagieuse (Bressolin, 2011). Ainsi, toutes les brebis avaient un agneau voire deux.

4.1.1.2 Stade physiologique

Lors de l'inoculation, les agneaux étaient âgés de 3 semaines (naissance entre le 28 et 29 octobre pour une inoculation le 17 novembre) et les brebis se situaient donc autour du pic de lactation (Fraysse et al., 1996). L'importance du stade physiologique pour l'expression clinique de l'agalaxie contagieuse a été montré chez la chèvre (Hasso et al., 1993) . Il est en effet plus difficile de mettre en évidence des signes cliniques chez les agneaux que les brebis en lactation (MacOwan et al., 1984; Sanchis et al., 1998). Il existe une relation forte entre le stade physiologique et l'expression clinique de l'agalaxie. Ainsi, il est judicieux d'avoir choisi des brebis en lactation pour suivre l'expression clinique de la maladie après inoculation ; les signes cliniques auraient dû être plus facilement repérables.

Par ailleurs, le fait qu'elles soient autour du pic de lactation facilite la détection d'une agalaxie car la chute de production physiologique est faible à cette période de la lactation. En revanche, les brebis choisies ne sont pas primipares et cela ne permet pas de s'affranchir de précédentes infections de la mamelle.

4.1.2 Conduite des animaux

Les brebis étaient toutes réunies dans le même box ; conditions de conduite qui se rapprochent de celles rencontrées en élevage. Il s'agit bien de comparer la croissance des souches *in vivo* et donc de respecter les conditions réelles d'élevage. Par ailleurs, toutes les conditions sont réunies pour le bien-être animal : les animaux n'ont pas faim ni soif et leur comportement peut s'exprimer (Goddard, 2011).

Par ailleurs, le fait de rassembler les animaux peut fausser quelques résultats. En effet, nous avons noté que certains agneaux volaient c'est-à-dire qu'ils tétaient une autre brebis que leur mère. Les agneaux voleurs peuvent téter des brebis qui excrètent le mycoplasme puis aller téter une autre brebis et déposer le mycoplasme sur les trayons de celle-ci. Or, nous savons que la contamination ascendante des mycoplasmes est possible (Tola et al., 1999). Cette contamination peut influencer sur les résultats de notre étude car nous voulons connaître la diffusion *in vivo* depuis le lieu d'inoculation des 2 souches de *Mycoplasma agalactiae*.

Notre lot d'animaux est composé de 6 brebis. Dans la bibliographie, les effectifs sont souvent de taille supérieure mais divisés en plusieurs lots de même taille que le nôtre. En effet, dans l'étude Sanchis et al. (2000), il y avait 29 brebis divisées en 6 groupes de cinq ou six brebis. L'étude de MacOwan et al. (1984) comptait, quant à elle, 9 agneaux divisés en trois groupes de trois animaux. Pour l'étude de Baranowski et al. (2014), il y avait 25 brebis réparties en cinq groupes de cinq. Ainsi, notre lot est similaire à ceux d'étude réalisée sur l'étude de la croissance de *Mycoplasma agalactiae* *in vivo*. De plus, nous avons retenu 6 animaux pour tenir compte de la variabilité individuelle tant en terme d'infection que d'expression clinique. Il s'agissait aussi, dans le cadre de l'éthique expérimentale, de limiter le nombre d'animaux.

4.1.3 Protocole d'inoculation

4.1.3.1 Choix des souches

Les 2 souches (PG2 et 5632) utilisées ont été choisies à partir d'expériences réalisées *in vitro* afin de déterminer la colonisation *in vivo* de ces 2 souches. La souche PG2 est la souche de référence internationale contrairement à la souche 5632 qui représente la variabilité de *Mycoplasma agalactiae*. Le pouvoir pathogène de PG2 est considéré comme modéré à très modéré lors de reproduction expérimentale. *In vitro*, la souche 5632 présente une croissance plus rapide que PG2 mais son pouvoir pathogène est peu documenté mis à part le fait qu'elle a été isolée à partir du liquide synovial de caprins présentant des symptômes d'arthrite.

4.1.3.2 Titre d'inoculation

Dans notre étude, la dose utilisée pour l'inoculation a été de 10^6 UFC/mL pour chaque souche et celles-ci ont été mélangées dans la seringue juste avant l'inoculation. La dose utilisée est moyenne et suffisante pour reproduire une infection expérimentale. Il a longtemps été utilisé des titres d'inoculation élevés : 10^8 ou 10^9 UFC/mL par exemple (Sanchis et al., 2000; MacOwan et al., 1984). Cependant, dans l'étude de Sanchis et al. (1998), les agneaux et agnelles ont été répartis en plusieurs groupes afin de tester différents titres d'inoculation par voie conjonctivale. Mais un titre de 10^7 UFC/mL au minimum était nécessaire pour obtenir des symptômes d'agalaxie contagieuse. En revanche, par voie sous-cutanée, des titres plus faibles ont reproduit une infection par *Mycoplasma agalactiae* : 10^5 UFC/mL. Des titres de 10^3 UFC/mL donnent moins de signes cliniques mais une excrétion dans le lait est malgré tout présente. (Baranowski et al., 2014). Le titre utilisé nous permet donc de mettre en évidence des signes cliniques et de suivre l'excrétion des souches dans le lait.

4.1.3.3 Voie d'inoculation

La voie d'inoculation choisie dans notre étude est la voie sous-cutanée. L'injection s'est faite en avant de l'épaule. L'infection expérimentale des brebis en lactation par voie sous-cutanée est un bon modèle pour reproduire l'infection systémique caractérisée, entre autres, par une excrétion de *Mycoplasma agalactiae* dans le lait (Baranowski et al., 2014).

C'est une voie d'inoculation pratique d'utilisation. En effet, les voies d'inoculation locales telles que la voie conjonctivale ou la voie intra-mammaire sont plus difficiles à maîtriser. Pour la voie conjonctivale (Sanchis et al., 1998), il existe également un risque de contamination entre animaux par contact.

Par ailleurs, l'étude de Hasso et al. (1993) s'est intéressée à la sévérité des symptômes de l'agalaxie contagieuse sur des chèvres selon la voie d'inoculation. Les animaux inoculés par voie sous-cutanée présentent des signes cliniques plus marqués que par la voie intra-mammaire. Les conditions physiologiques et épidémiologiques comme la voie d'inoculation jouent probablement un rôle important sur l'expression des signes cliniques de la maladie (Sanchis et al., 2000). La voie sous-cutanée permet également une bactériémie plus longue comparée à la voie intratrachéale ou intraveineuse ou encore une infection par contact (MacOwan et al., 1984).

En revanche, la voie intra-mammaire ne correspondait pas au but de notre étude. En effet, nous souhaitons étudier et comparer la multiplication, la colonisation et la capacité d'excrétion de 2 souches de *Mycoplasma agalactiae in vivo*. Or, la voie sous-cutanée est connue pour permettre la colonisation *in vivo* de *Mycoplasma agalactiae*. Ainsi, nous aurions pu comparer la capacité de colonisation de nos 2 souches. La voie intra-mammaire est malgré tout intéressante car l'infection peut être rapidement établie (dès 4 jours) (Sanchis et al., 2000).

La voie sous-cutanée semble donc la plus pratique et la plus adaptée dans le cadre de notre expérimentation.

4.1.4 Conduite de l'expérimentation

4.1.4.1 Durée de l'expérimentation

Mycoplasma agalactiae peut survivre pendant au moins 56 jours au point d'inoculation mais également dans les nœuds lymphatiques à un taux significatif. Lors de contextes physiologiques particuliers tels que la lactation ou la gestation, l'infection latente peut se répandre jusqu'aux organes cibles de *Mycoplasma agalactiae* : la mamelle ou les articulations (Sanchis et al., 1998). De même, l'excrétion peut avoir lieu entre le 7^{ème} et le 60^{ème} jour post infection (Bergonier et al., 1997). Or, notre étude n'a duré que 30 jours. Trente jours de plus nous auraient assuré qu'aucune colonisation par la souche 5632 n'aurait eu lieu par la suite.

Cependant, certaines études n'ont duré que 28 jours et toutes les brebis ont excrété les mycoplasmes dans le lait dans ce délai (Baranowski et al., 2014; Bressolin, 2011). En regard de cela et pour des raisons locales, notre étude n'a duré que 30 jours.

4.1.4.2 Suivi clinique et prélèvements

Tous les jours, les agneaux étaient séparés de leur mère durant 2 heures afin de pouvoir prélever du lait. Deux heures de séparation ne sont peut-être pas suffisantes pour pouvoir repérer clairement une agalaxie. En effet, dans l'étude de Baranowski et al. (2014) et les travaux d'autres (Bressolin, 2011 ; Galisson, 2001), les agneaux étaient séparés des brebis au moins 12 heures avant. Cependant, dans notre étude, l'objectif n'était pas de quantifier précisément l'agalaxie mais seulement de déterminer si les mycoplasmes diffusaient dans le lait. Nous voulions simplement évaluer la qualité du lait et non la quantité produite par les brebis.

Les inspections des mamelles ainsi que les examens cliniques étaient réalisées deux fois par semaine par 3 opérateurs ce qui a pu introduire un biais lié à la variabilité entre opérateurs. Cependant cette variabilité influe peu sur notre étude car les critères évalués sont précis (exemple : taille des nœuds lymphatiques). Il existe un effet opérateur malgré tout car les inspections des mamelles étaient réalisées selon l'examen précédent. Ainsi, malgré des critères précis, il aurait été préférable d'inspecter les mamelles sans connaître les résultats préalables.

Les prélèvements de lait ont eu lieu tous les jours. La périodicité des prélèvements est beaucoup plus élevée que lors de précédentes études où le lait était collecté une à trois fois par semaine (Sanchis et al., 2000; Baranowski et al., 2014). Cette fréquence a été choisie afin de déterminer précisément le jour du début de l'excrétion de *Mycoplasma agalactiae* et de détecter des excréctions intermittentes.

Les prélèvements de sang des agneaux et des brebis étaient réalisés deux fois par semaine comme dans les études de Baranowski et al. (2014) et de Sanchis et al. (1998). Cependant, un seul prélèvement de sang a été réalisé avant l'inoculation. Or, dans de nombreuses études, des prélèvements étaient collectés une semaine ou 5 jours avant l'inoculation (Sanchis et al., 2000; Sanchis et al., 1998; Baranowski et al., 2014). De la même façon, les examens cliniques étaient effectués avant le début des expérimentations pour repérer des anomalies et être le plus objectif sur les examens suivants. Dans notre étude, il n'y a pas de problème d'homogénéité car chaque animal est son propre témoin et les maladies antérieures à notre étude n'auront pas d'impact.

4.1.4.3 Autopsie

Les autopsies sont complètes dans le cadre de notre étude et permettent d'observer des signes évocateurs d'agalactie. En effet, nous avons observé tous les organes cibles de l'agalaxie contagieuse (les mamelles, les yeux et les articulations). La colonisation des mycoplasmes au sein des brebis mais également des agneaux a ainsi été mise en évidence. Les autopsies permettent de confirmer les examens cliniques.

Cependant, lors des examens post-mortem, il aurait pu être intéressant de prélever du liquide synovial pour tenter de détecter la présence de *Mycoplasma agalactiae* par culture ou PCR (Bergonier, Berthelot, 2008). Cependant, les mycoplasmes sont retrouvés dans les articulations lorsque des boiteries sont détectées à l'examen clinique (MacOwan et al., 1984). En effet, l'articulation est un milieu stérile et la présence d'une bactérie entraîne des signes cliniques.

4.2 Discussion des résultats

4.2.1 Analyses de lait

4.2.1.1 Bactériologie classique

Dans le cas particulier de notre étude (inoculation de mycoplasmes), l'ensemencement du lait sur gélose au sang a permis de suspecter l'excrétion de mycoplasmes dans lait lorsqu'une hémolyse sans colonie était observée. C'est le cas du côté gauche de la brebis 4 et du côté droit de la brebis 6. Pour ces brebis, une ou les 2 souches injectées ont circulé du point d'injection jusqu'aux mamelles. En bactériologie classique, nous notons que la brebis 4 excrète à partir du 24 novembre soit 7 jours après l'inoculation et la brebis 6 le 27 novembre soit 10 jours après l'inoculation. Cependant, les bactériologies classiques ne sont réalisées que deux fois par semaine ; nous ne pouvons déterminer avec précision le jour de début d'excrétion. Cette date sera déterminée avec plus de précision grâce aux PCR.

En revanche, nous notons la présence d'un staphylocoque à coagulase négative dans l'hémi-mamelle droite de la brebis 2 dès le début de l'expérimentation. Il aurait probablement été intéressant de réaliser une bactériologie avant le début de l'expérimentation pour exclure des animaux porteurs d'autres éléments pathogènes dans les mamelles. Mais pour des raisons pratiques, les brebis n'ont pas pu être prélevées avant le début de l'expérimentation. Les brebis ont donc été choisies uniquement sur des critères cliniques : inspection de la mamelle et palpation des nœuds lymphatiques. La présence d'autres agents pathogènes peut influencer sur les symptômes mammaires voire sur la température rectale. Une infection intra-mammaire préexistante pourrait constituer un biais pour notre étude.

4.2.1.2 Colony blot

Grâce aux Colony Blot, nous pouvons savoir quelle souche est présente dans le lait. A partir du 27 novembre, deux brebis sur les six présentent des colonies de mycoplasmes. Le colony blot est complémentaire de la PCR et permet d'avoir une appréciation quantitative. Il y a une proportion plus importante de colonies de la souche PG2 en particulier dans l'hémi-mamelle gauche de la brebis 4 et la droite de la brebis 6. Il y a également une excrétion intermittente de PG2 dans l'hémi-mamelle droite de la brebis 4. Les colony blot confirment les résultats de la PCR et montrent un nombre de colonies important dans le lait.

4.2.1.3 PCR

Les résultats de la PCR vont dans le même sens que les résultats des Colony Blot. En effet, des PCR ont été réalisées tous les jours sur le lait de l'hémi-mamelle de chaque brebis afin de montrer la présence des souches de mycoplasmes injectées. Finalement, seules les brebis 4 et 6 excrètent le mycoplasme et seule la souche PG2 est retrouvée. Comme pour les colony blot, les résultats semblent indiquer que seule la souche PG2 colonise les organismes des brebis et peut donc être excrétée mais pour seulement un tiers de l'effectif de brebis. Nous voyons également une excrétion intermittente pour la mamelle droite de la brebis 4.

Lors de précédentes études (Baranowski et al., 2014), l'inoculation sous-cutanée de la souche PG2 a induit une excrétion dans le lait de toutes les brebis. Cependant l'excrétion dans le lait se fait entre le 7^{ème} et le 60^{ème} jour post-inoculation (Bergonier et al., 1997). Nous ne pouvons pas exclure une excrétion tardive d'une ou des deux souches ; c'est-à-dire une excrétion dans le lait après le temps de notre expérimentation. Par ailleurs, l'excrétion d'agent pathogène dans le lait dépend de la variabilité individuelle. En effet, les brebis étaient en très bon état et nous nous sommes affranchis du stress post-agnelage car notre étude a commencé trois semaines post-partum. Mais ceci n'explique pas une excrétion retardée car la souche PG2 colonise et est excrétée dans le temps de l'étude malgré le bon état des brebis. En effet, dans les travaux précédents de Bressolin (2011) et Galisson (2001), *Mycoplasma agalactiae* était excrété dans le lait dans les 20 jours après l'inoculation malgré des brebis choisies avec les mêmes critères que les nôtres.

4.2.2 Suivi clinique

Lors des examens cliniques, seules deux brebis ont montré des pics de température au-dessus de 40°C. En effet, la brebis 2 est en hyperthermie à 40°C le 24 novembre mais ce pic peut être attribué au stress des manipulations. En revanche, la brebis 6 est en hyperthermie le 21 et le 24 novembre. Or, la mise en évidence d'un pic d'hyperthermie chez les animaux inoculés n'est pas facile. Dans les études de Sanchis et al. (1998) et MacOwan et al. (1984), les suivis cliniques n'ont pas permis de montrer un pic d'hyperthermie. En revanche, dans l'étude d'Or et al. (2005), ceux-ci ont mis en évidence une légère augmentation des températures rectales. Le pic d'hyperthermie de la brebis 6 peut probablement être associé à la colonisation de l'organisme par *Mycoplasma agalactiae*. Il serait intéressant, dans les études ultérieures, de mesurer la température « en continu » à l'aide de capteurs par exemple.

Concernant la symétrie de la mamelle, l'asymétrie mammaire observée chez plusieurs brebis peut être évocatrice d'une mammite associée à la présence du mycoplasme. En effet, parmi les signes caractéristiques de l'agalaxie contagieuse, nous retrouvons une hypogalaxie voire une agalaxie ainsi qu'une mammite unilatérale ou bilatérale (Bergonier et al., 1997) mais les signes locaux ne sont pas pathognomoniques de l'agalaxie contagieuse. Le déséquilibre de la mamelle est donc un signe évocateur de mammite et, dans notre cas, cela montre la diffusion des souches de mycoplasmes. Cependant, l'agent pathogène peut circuler dans l'organisme et ne pas entraîner de symptômes mammaires. Par exemple, dans les études de Baranowski et al (2014) et Galisson (2001), lors d'inoculation sous-cutanée, les brebis ont présenté peu de symptômes mammaires.

Ces signes de mammites sont soulignés par la palpation des nœuds lymphatiques. En effet, les brebis 2 et 4 ont excrété le mycoplasme et leurs nœuds lymphatiques rétro-mammaires sont réactionnels. Cependant, deux brebis n'ont pas d'asymétrie de la mamelle mais ont des nœuds lymphatiques rétro-mammaires droits réactionnels. Mais ce sont des brebis qui ont présenté des isolements bactériens en parallèle, ce qui peut nous empêcher de les relier à l'infection mycoplasmique.

Par ailleurs, aucune arthrite n'est détectée ni sur les brebis ni sur les agneaux. De même aucun signe oculaire n'est mis en évidence.

En conclusion, l'infection par *Mycoplasma agalactiae* ne peut pas expliquer tous les symptômes relevés lors de l'étude. En effet, quatre brebis ont présenté des symptômes mammaires mais seules deux brebis ont excrété des mycoplasmes dans le lait.

4.2.3 Western blot

Le western blot a permis de mettre en évidence des anticorps circulants pour les 2 souches. Cela a permis de mettre en évidence une réaction immunitaire vis à vis des deux souches inoculées. Celles-ci ont bien été présentées au système immunitaire. Mais pour quatre brebis, les 2 souches n'atteignent pas toujours les mamelles comme l'ont montré les bactériologies et les PCR sur le lait.

4.2.4 Autopsie

L'état général des brebis était bon et aucun signe d'arthrite ou de kératite n'est noté. Il n'y a pas de lésions évocatrices sur les lieux habituels de la colonisation de *Mycoplasma agalactiae*, il ne semble pas qu'il y ait d'atteinte des organes. L'état général des agneaux est également bon, ils ne semblent pas amaigris ce qui aurait pu être le signe d'une agalaxie des mères. Pour eux non plus, *Mycoplasma agalactiae* n'aurait pas diffusé aux organes cibles.

Les mamelles sont normales d'aspect extérieur. Il aurait pu paraître intéressant de prélever un échantillon des mamelles et éventuellement de faire des analyses histologiques ou d'utiliser des techniques de marquage *in situ* à l'aide d'anticorps spécifiques pour révéler la présence de *Mycoplasma agalactiae*. Nous pouvons en effet imaginer que les souches ont peut-être diffusé jusqu'à la mamelle et sont restées en latence. Grâce à la technique précédente, nous aurions pu mettre en évidence une colonisation sans excrétion. Il peut être intéressant lors d'une prochaine étude de réaliser la mise en évidence des mycoplasmes dans le tissu mammaire.

A l'examen nécropsique, nous avons constaté une hypertrophie des nœuds lymphatiques pré-scapulaires drainant le site d'inoculation chez toutes les brebis. En effet, ceux-ci sont modifiés en relation avec le lieu d'inoculation. De même, les nœuds lymphatiques parotidiens sont modifiés chez 5 brebis sur 6, nous pouvons penser que les mycoplasmes ont circulé chez ces animaux. Or, les nœuds parotidiens drainent les yeux qui sont des organes cibles de l'agalaxie contagieuse.

Nous pouvons également ajouter que les nœuds lymphatiques rétro-mammaires des brebis excréant les mycoplasmes sont très modifiés. En effet, les nœuds lymphatiques rétro-mammaires drainent la mamelle et sont le lieu de la réponse immunitaire lors d'infection de la mamelle. L'hypertrophie des nœuds lymphatiques rétro-mammaires n'est cependant pas pathognomonique des mycoplasmes mais est le signe d'une inflammation mammaire. Grâce aux bactériologies et aux PCR, nous pouvons savoir quel agent est responsable de cet adénomégalie.

4.2.5 Analyse post-mortem

4.2.5.1 Bactériologie et PCR des nœuds lymphatiques

Les cultures des nœuds lymphatiques pré-scapulaires sont positives pour toutes les brebis. De même, les cultures sont positives pour les nœuds lymphatiques rétro-mammaires gauche de la brebis 4 et droit de la brebis 6. Cela confirme les analyses macroscopiques faites à l'autopsie.

Nous pouvons déjà noter une nette différence entre les PCR directes sur les nœuds lymphatiques et les PCR après cultures. En effet, les PCR réalisées après cultures montrent plus de résultats positifs que les PCR réalisées directement sur les organes. Dans un premier temps, nous réalisons des PCR directement sur les nœuds lymphatiques mais étant donné le faible nombre de résultats positifs, nous avons mis en culture les organes puis réalisé les PCR. Nous augmentons donc la sensibilité des PCR.

Pour toutes les brebis, des mycoplasmes sont mis en évidence lors des PCR après culture sur les nœuds lymphatiques pré-scapulaires et toutes les brebis présentent la souche 5632. La brebis 5 présente également la souche PG2. Ces lésions retrouvées sur les nœuds lymphatiques pré-scapulaires sont à mettre en relation avec le point d'inoculation. Ce sont, d'ailleurs, les seuls organes présentant la souche 5632. En effet, les nœuds lymphatiques ont drainé les agents pathogènes au point d'injection pour lutter contre la colonisation par *Mycoplasma agalactiae*. Pour les nœuds lymphatiques rétro-mammaires, des mycoplasmes sont présents pour les brebis excréant *Mycoplasma agalactiae* dans le lait. Seule la souche PG2 est retrouvée dans les nœuds lymphatiques comme c'était le cas dans le lait. En effet, les nœuds lymphatiques drainent la mamelle et mettent en évidence le passage de la souche PG2 dans les mamelles de seulement 2 des 6 brebis inoculées.

La brebis 4 présente également des mycoplasmes dans le nœud lymphatiques parotidiens. Cela peut signifier une colonisation de tout l'organisme par l'agent infectieux.

Les tonsilles de quatre agneaux contiennent des mycoplasmes (en particulier la souche PG2). Les tonsilles sont des bons marqueurs de contact avec le mycoplasme par la tétée. En effet, ce sont les premières formations lymphoïdes rencontrées par les agents pathogènes lors de contamination par voie orale puisqu'elles sont présentes au niveau de la muqueuse pharyngienne. L'atteinte des tonsilles par *Mycoplasma agalactiae* note un début d'infection des agneaux et traduit le fait que les agneaux ont consommé un aliment contaminé (le lait). Parmi ces agneaux, nous retrouvons la descendance des 2 brebis qui excrètent le mycoplasme. Pour les 2 autres agneaux, nous pouvons penser que ce sont des agneaux voleurs qui ont tété les brebis excrétrices. Une autre hypothèse est envisageable, les agneaux des brebis excrétrices ont tété d'autres brebis (pour pallier au manque de lait de leur mère) et ont ainsi déposé des mycoplasmes sur les trayons ; ceux-ci ont finalement atteint les agneaux qui ont tété par la suite. En effet, les agneaux voleurs de lait ont un rôle dans la transmission de différentes pathologies mammaires (Bergonier et al., 1997).

Cependant, *Mycoplasma agalactiae* n'a été mis en évidence dans aucun des nœuds lymphatiques des agneaux. La mise en évidence dans les tonsilles montre que les agneaux ont commencé à s'infecter. En prolongeant le suivi des animaux, nous aurions peut-être pu observer des symptômes chez les agneaux et détecter des mycoplasmes dans leurs nœuds lymphatiques.

4.2.5.2 PCR des écouvillons

La souche 5632 est présente dans l'écouvillon oculaire de la brebis 2. Nous savons que l'œil est un des organes cibles des mycoplasmes. Il est probable que cet écouvillon montre un début de colonisation de la souche 5632 dans l'organisme mais nous n'avons qu'un seul prélèvement donc nous ne pouvons pas conclure sur la date de colonisation par *Mycoplasma agalactiae* dans l'œil. Une autre hypothèse est possible : nous savons que les brebis sont des animaux grégaires. Or, la brebis 5 a déclaré un abcès au point d'injection et nous pouvons penser que des agents pathogènes étaient présents au niveau de l'abcès. La brebis 2 peut s'être contaminée par contact direct avec l'abcès.

La brebis 4 a présenté des mycoplasmes PG2 dans l'écouvillon nasal. La détection de la souche PG2 dans l'écouvillon nasal d'une brebis suggère, compte tenu du tropisme respiratoire de *Mycoplasma agalactiae*, une large colonisation de cet animal (Bergonier et al., 1997). Cette observation plaide encore pour un suivi plus prolongé des animaux.

Pour les écouvillons des agneaux, nous notons que les mycoplasmes sont retrouvés sur 2 écouvillons nasaux (agneaux 3 et 4). Nous pouvons penser que les agneaux se sont contaminés par contact avec les mères et/ou lors de la tétée. En effet, l'infection par voie conjonctival existe et peut conduire à une infection de tous les organes cibles de *Mycoplasma agalactiae* (Sanchis et al., 1998). Ce résultat montre qu'une étude plus longue aurait été intéressante pour savoir quand a eu lieu la contamination et si l'infection des organes cibles s'est faite de manière tardive.

Même si les mycoplasmes ont un tropisme pour l'appareil respiratoire, nous avons vu plus haut qu'ils n'ont pas colonisé les organismes des agneaux. Mais la présence de mycoplasmes chez l'agneau 3 est surprenante. En effet, sa mère n'excrète aucune des souches inoculées. Or, les animaux vivent en communauté pendant toute l'étude et le simple contact peut permettre la diffusion des mycoplasmes. Nous avons noté pendant l'étude des problèmes de vol des agneaux. Les agneaux voleurs de lait jouent un rôle dans la transmission du pathogène. Ils peuvent par exemple téter une brebis excréant *Mycoplasma agalactiae* et le déposer sur le trayon d'une autre brebis ; celui-ci sera alors tété par un autre agneau qui pourra se contaminer. Ainsi, ceux-ci peuvent permettre la contamination ascendante d'une

brebis mais également la contamination d'autres agneaux. Cette observation constitue un biais pour notre étude. En effet, le but était de comparer la colonisation et la croissance in vivo de 2 souches à partir d'un point d'inoculation. Or les agneaux voleurs peuvent conduire à la contamination ascendante d'une seule souche et nous empêcher de comparer effectivement la colonisation depuis le point d'inoculation choisi.

Deux agneaux ont présenté des mycoplasmes dans les écouvillons auriculaires. La positivité est facilement explicable pour l'agneau dont la mère a excrété *Mycoplasma agalactiae*. Cependant, la souche 5632 est mise en évidence par PCR : cela peut-être expliqué par le contact avec la brebis 2 ainsi que l'abcès de la brebis 5. Pour l'autre agneau, la présence des mycoplasmes s'interprète comme pour l'écouvillon nasal de l'agneau 3.

4.3 Perspectives

Dans les conditions de notre étude, seule la souche PG2 a diffusé, colonisé et a été excrétée dans le lait. Nous pouvons nous demander si la souche 5632 est capable de coloniser l'organisme des ovins. En effet, elle a été isolée à partir de caprins. Il serait intéressant d'étudier la colonisation et la diffusion de la souche 5632 seule et sur un temps plus long (60 jours par exemple (Baranowski et al., 2014)) afin de pouvoir conclure sur la différence de colonisation des 2 souches : PG2 et 5632. Il faudrait également s'assurer que la souche 5632 n'atteint pas la mamelle, pour y rester en latence, grâce à la mise en évidence des mycoplasmes par des anticorps spécifiques dans la mamelle à l'autopsie.

Il serait également intéressant de pouvoir séparer les brebis avec leurs agneaux afin d'éviter le vol. Par exemple, il serait envisageable de mettre les brebis dans un même box mais de les séparer dans des cases ouvertes pour qu'elles voient les autres brebis. Cela limiterait également les contaminations par contact. Cette méthode semble respecter au mieux l'instinct grégaire des moutons et le bien-être animal si chaque case a une surface suffisante (Annexe de l'Arrêté Ministériel du 1^{er} février 2013). Nous pourrions envisager une organisation selon la figure 7.

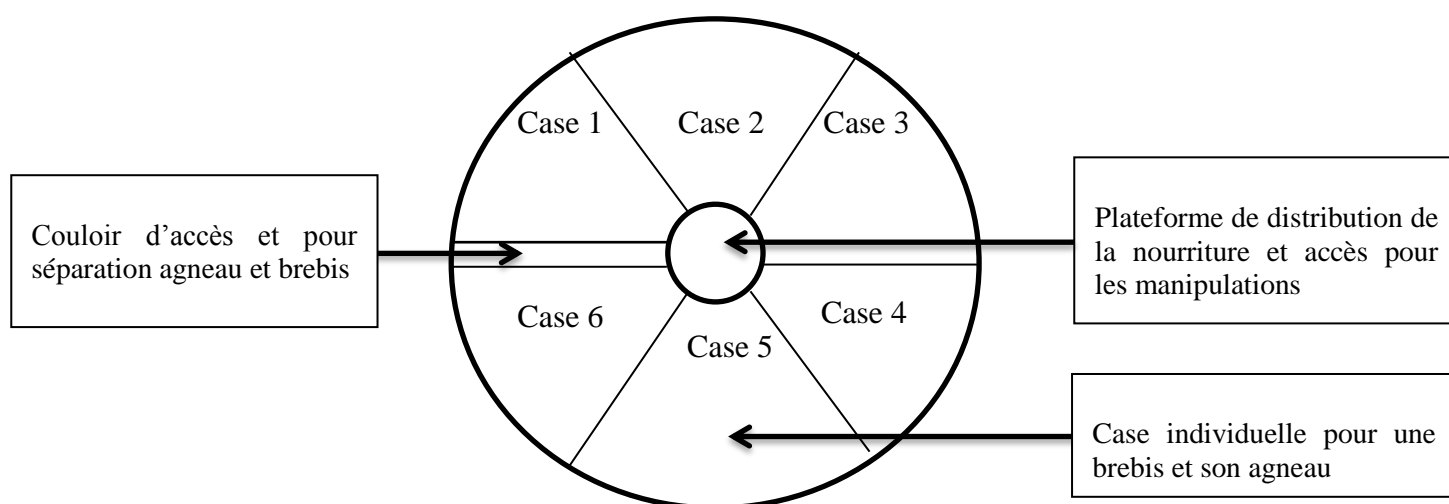


Figure 10 : Proposition d'une organisation en case individuelle

Pour le suivi clinique, la pose d'un capteur mesurant la température et l'activité à demeure permettrait un suivi plus régulier de ces deux paramètres. Ce suivi permettrait de savoir s'il y a un pic d'hyperthermie associé à l'excrétion d'une des souches dans le lait et le podomètre de mettre en évidence une éventuelle boiterie.

Il faudrait réaliser plus d'écouvillons oculaires, nasaux et auriculaires sur la durée de l'étude afin d'avoir un suivi sur la diffusion des souches : un à deux écouvillons par semaine permet d'avoir un aperçu de la contamination et la diffusion tout au long des manipulations. Le problème réside dans le coût et la charge de travail engendrés.

5 Conclusion

Notre étude clinique a permis de comparer la croissance, la colonisation et la diffusion de deux souches de *Mycoplasma agalactiae in vivo* chez la brebis suitée afin de confirmer ou infirmer une hypothèse émise lors d'étude *in vitro*.

In vitro, la souche 5632 a une croissance plus rapide. Cependant, nous avons observé qu'*in vivo*, seule la souche PG2 a diffusé et colonisé l'organisme de certaines brebis. En effet, seules deux brebis ont montré des signes cliniques et excrété cette souche de *Mycoplasma agalactiae* dans le lait pendant 3 semaines. La souche 5632 est restée au point d'injection et n'a pas colonisé l'organisme. Nous la retrouvons seulement dans les nœuds lymphatiques pré-scapulaires. Chez les deux brebis qui excrètent la souche PG2, celle-ci a colonisé tout l'organisme : des différents organes cibles (yeux, mamelles, appareil respiratoire...) aux nœuds lymphatiques. Le modèle *in vivo* n'a pas permis de confirmer l'hypothèse émise au vu des résultats obtenus *in vitro*. Ainsi, les différences génétiques entre les 2 souches ne semblent pas influencer sur la colonisation de l'organisme.

Le temps de notre étude, nous n'avons pas pu montrer la diffusion des mycoplasmes dans l'organisme des agneaux mais un début de contamination a été mis en évidence au niveau des tonsilles.

Pour conclure, cette étude pilote, limitée dans le temps, avait pour but de tester l'hypothèse d'une colonisation plus rapide par 5632 que par PG2. La souche 5632 a seulement été présentée au système immunitaire sans colonisation ni excrétion.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Xavier BERTHELOT, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **AMBLARD Océane** intitulée « *Etude de la diffusion in vivo de Mycoplasma agalactiae chez la brebis : essai préliminaire..* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 19 juillet 2016
Professeur Xavier BERTHELOT
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jacques IZOPET

Professeur Jacques IZOPET
Chargé de Service de Virologie
Plateau Technique d'Infectiologie
Institut Fédératif de Biologie
330, avenue de Grande-Bretagne
TSA 40031 - 31059 TOULOUSE Cedex 9
Tél. 05 67 69 04 22 - Fax 05 67 69 04 25

Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRIEU-OBRECHT

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

6 **Bibliographie**

- Baranowski, E., D. Bergonier, E. Sagné, M.C. Hygonenq, P. Ronsin, X. Berthelot, et C. Citti. 2014a. « Experimental Infections with *Mycoplasma agalactiae* Identify Key Factors Involved in Host-Colonization ». Édité par M. F. Balish. *PLoS ONE* 9 (4): e93970.
- Baranowski, E., D. Bergonier, E. Sagné, M-C. Hygonenq, P. Ronsin, X. Berthelot, et C. Citti. 2014b. « Experimental infections with *Mycoplasma agalactiae* identify key factors involved in host-colonization ». *PloS One* 9 (4): e93970.
- Becker, C., F. Ramos, E. Sellal, S. Moine, F. Poumarat, et F. Tardy. 2012. « Development of a multiplex real-time PCR for contagious agalactia diagnosis in small ruminants ». *Journal of Microbiological Methods* 90 (2): 73-79.
- Bergonier, D., et X. Berthelot. 2008. "Mycoplasmoses des petits ruminants : le syndrome d'agalactie contagieuse." *Bull. Acad. Vét. France*, 161, 167-177.
<http://documents.irevues.inist.fr/handle/2042/47940>.
- Bergonier, D., X. Berthelot, et F. Poumarat. 1997. « Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control ». *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* 16 (3): 848-73.
- Bonnefin, N. 2003. « Comparaison de la souche 7784 hypovirulente de *Mycoplasma agalactiae* à la souche type virulente PG2 par la technique d'hybridation soustractive suppressive ». <http://oatao.univ-toulouse.fr/1904/>.
- Bressolin, A. 2011. « Reproduction expérimentale de l'agalactie contagieuse à *Mycoplasma agalactiae* chez la brebis en lactation ». Thèse de doctorat vétérinaire, Université de Toulouse, 64p. <http://oatao.univ-toulouse.fr/4583/>.
- Buonavoglia, D., A. Fasanella, G. Greco, et A. Pratelli. 1999. « A study of an experimental infection of sheep with *Mycoplasma agalactiae* ». *The New Microbiologica* 22 (1): 27-30.
- Fleury, B., D. Bergonier, X. Berthelot, E. Peterhans, J. Frey, et E. M. Vilei. 2002. « Characterization of P40, a Cytadhesin of *Mycoplasma agalactiae* ». *Infection and Immunity* 70 (10): 5612-21.
- Frisoni, E., M. Marena, E. Sagné, L. Nouvel, R. Guérillot, P. Glaser, A. Blanchard, et al. 2013. « ICEA of *Mycoplasma agalactiae* : a new family of self-transmissible integrative elements that confers conjugative properties to the recipient strain: *Mycoplasma* ICE on the move ». *Molecular Microbiology* 89 (6). <http://doi.wiley.com/10.1111/mmi.12341>.
- Galisson, C. 2001. « Evaluation clinique du pouvoir pathogène d'une souche réputée avirulente de *M. Agalactiae* ». Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul Sabatier - Toulouse III, 50 p. <http://oatao.univ-toulouse.fr/231/>

- Gautier-Bouchardon, A., S. Ferré, D. Le Grand, A. Paoli, E. Gay, et F. Poumarat. 2014. « Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France ». *PLoS One* 9 (2): e87672.
- Goddard, P. 2011. « Welfare assessment in sheep ». *In Practice* 33 (10): 508-16.
- Gómez-Martín, A., J. Amores, A. Paterna, et C. De la Fe. 2013. « Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: epidemiology and prospects for diagnosis and control ». *Veterinary Journal (London, England: 1997)* 198 (1): 48-56.
- Groupe de travail « Agalactie contagieuse dans les Pyrénées-Atlantiques ». 2011. « Agalactie contagieuse dans les Pyrénées-Atlantiques ». ANSES.
<https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT2009sa0156Ra.pdf>.
- Hasso, S.A., J.M. Al-Aubaidi, et A.M. Al-Darraj. 1993. « Contagious agalactia in goats: It's severity as related to the route of infection and pregnancy ». *Small Ruminant Research* 10 (3): 263-75.
- Kumar, A., A. Rahal, S. Chakraborty, A. Verma, et K. Dhama. 2014. « *Mycoplasma agalactiae*, an Etiological Agent of Contagious Agalactia in Small Ruminants: A Review ». *Veterinary Medicine International* 2014: 1-13.
- « Les Races de Massif - CORAM - Collectif des Races locales des Massifs (ovins, bovins) ». s. d.
<http://www.races-montagnes.com/>.
- MacOwan, K. J., T. F. Brand, N. McGillveray, et A. R. Hunter. 1984. « Experimental infection of castrated lambs with *Mycoplasma agalactiae* ». *Journal of hygiene* 93 (03): 455-63.
- Marenda, M., V. Barbe, G. Gourgues, S. Mangenot, E. Sagne, et C. Citti. 2006. « A new integrative conjugative element occurs in *Mycoplasma agalactiae* as chromosomal and free circular forms ». *Journal of Bacteriology* 188 (11): 4137-41.
- Marenda, M. S. 2005. « Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences ». *Microbiology* 151 (2): 475-89.
- Marenda, M. S., E. M. Vilei, F. Poumarat, J. Frey, et X. Berthelot. 2004. « Validation of the suppressive subtractive hybridization method in *Mycoplasma agalactiae* species by the comparison of a field strain with the type strain PG2 ». *Veterinary Research* 35 (2): 199-212.
- McAuliffe, L., C. Churchward, J. Lawes, G. Loria, R. Ayling, et R. Nicholas. 2008. « VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *Mycoplasma agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia ». *BMC Microbiology* 8 (1): 193.
- Nouvel, L-X., P. Sirand-Pugnet, M. Marenda, E. Sagné, V. Barbe, S. Mangenot, C. Schenowitz, D. Jacob, A. Barré, et S. Claverol. 2010. « Comparative genomic and proteomic analyses of two *Mycoplasma agalactiae* strains: clues to the macro-and micro-events that are shaping mycoplasma diversity ». *BMC genomics* 11 (1): 1.

- Nouvel, L-X. 2009. « Etude de la diversité génétique de *Mycoplasma agalactiae*: plasticité des génomes, mobilome et dynamique de surface ». Thèse d'université, Institut National Polytechnique, Toulouse. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000999/>.
- Razin, S., D. Yogev, et Y. Naot. 1998. « Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas ». *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 62 (4): 1094-1156.
- Sanchis, R., G. Abadie, M. Lambert, E. Cabasse, P. Dufour, J. M. Guibert, et M. Pépin. 2000. « Inoculation of lactating ewes by the intramammary route with *Mycoplasma agalactiae*: comparative pathogenicity of six field strains ». *Veterinary Research* 31 (3): 329-37.
- Sanchis, R., G. Abadie, M. Lambert, E. Cabasse, J.-M. Guibert, M. Calamel, P. Dufour, C. Vitu, M. Vignoni, et M. Pépin. 1998. « Experimental conjunctival-route infection with *Mycoplasma agalactiae* in lambs ». *Small Ruminant Research* 27 (1): 31-39.
- Sharma, S., C. Citti, E. Sagné, M. Marenda, P. F. Markham, et G. F. Browning. 2015a. « Development and host compatibility of plasmids for two important ruminant pathogens, *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* ». *PloS One* 10 (3): e0119000.
- Sirand-Pugnet, P., C. Citti, A. Barré, et A. Blanchard. 2007. « Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns ». *Research in Microbiology* 158 (10): 754-66.
- Sirand-Pugnet, P., C. Lartigue, M. Marenda, D. Jacob, A. Barré, V. Barbe, C. Schenowitz, et al. 2007. « Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome ». *PLoS genetics* 3 (5): e75.
- Tardy, F., E. Baranowski, L-X. Nouvel, V. Mick, L. Manso-Silván, F. Thiaucourt, P. Thébault, et al. 2012. « Emergence of atypical *Mycoplasma agalactiae* strains harboring a new prophage and associated with an alpine wild ungulate mortality episode ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (13): 4659-68.
- Tola, S., D. Manunta, S. Rocca, A. M. Rocchigiani, G. Idini, P. P. Angioi, et G. Leori. 1999. « Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines ». *Vaccine* 17 (22): 2764-68.

7.1 Annexe 1 : Tableaux des suivis cliniques des brebis

Brebis 5		17/11/2014	21/11/2014	24/11/2014	27/11/2014	01/12/2014	05/12/2014	08/12/2014	11/12/2014
Température rectale	39,1°C	39,7°C	Légère à D	39,5°C	39,4°C	39,3°C	39,1°C	39,5°C	39,5°C
Symétrie de la mamelle	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Consistance de la mamelle	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène
Température de la mamelle	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède
Lésions peau trayon	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
Nœud lymphatique rétro-mammaire	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux
Lait	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
Boiterie	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
Signes oculaires	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
Autres			Abcès épaule D	Abcès épaule D	Abcès épaule D				
Brebis 6		17/11/2014	21/11/2014	24/11/2014	27/11/2014	01/12/2014	05/12/2014	08/12/2014	11/12/2014
Température rectale	39,8°C	40,3°C	40,5°C	39,5°C	38,7°C	39,2°C	39,1°C	39,1°C	39,4°C
Symétrie de la mamelle	Oui	Légère à D	Oui	Oui	Légère à D	Légère à D	Légère à D	Légère à D	Asymétrie à D
Consistance de la mamelle	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène
Température de la mamelle	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède
Lésions peau trayon	Abcès cutané D	Abcès caséux entre mamelle et pte aine à D	RAS	RAS	RAS	RAS	Echyma G	Echyma G	Echyma G
Nœud lymphatique rétro-mammaire	D : Normal / G : réactionnel	Réactionnels (G : taille mandarine et D plurilobé ; taille noix)	Réactionnels (G > D)	Réactionnels (G > D)	Réactionnels (G > D)	Réactionnels (G > D)	Réactionnels (G > D)	Réactionnels (G > D)	Réactionnels (G > D)
Lait	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
Boiterie	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
Signes oculaires	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS

Brebis 3		17/11/2014	21/11/2014	24/11/2014	27/11/2014	01/12/2014	05/12/2014	08/12/2014	11/12/2014
Température rectale	39,5°C	39,5°C	39,5°C	39,4°C	39,1°C	39,5°C	39,4°C	NE	39,4°C
Symétrie de la mamelle	Oui	Oui	Oui	Oui	Légère à D	Oui	Oui	Oui	Oui
Consistance de la mamelle	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène
Température de la mamelle	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède
Lésions peau trayon	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
Nœud lymphatique rétro-mammaire	D : légèrement hypertrophié / G : normal	D : réactionnel / G : normal	D : réactionnel / G : normal	D : réactionnel / G : normal	D : réactionnel / G : normal	D : réactionnel / G : normal	D : réactionnel / G : normal	D : réactionnel / G : normal	D : réactionnel / G : normal
Lait	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
Boiterie	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
Signes oculaires	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
Brebis 4		17/11/2014	21/11/2014	24/11/2014	27/11/2014	01/12/2014	05/12/2014	08/12/2014	11/12/2014
Température rectale	39,3°C	39,3°C	39,4°C	39,6°C	39,1°C	39,1°C	39,4°C	39,1°C	38,9°C
Symétrie de la mamelle	Oui	Oui	Oui	Légère à G	Légère à G	Légère à G	Oui	Légère à G	Oui
Consistance de la mamelle	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène
Température de la mamelle	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède	Tiède
Lésions peau trayon	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	Petit abcès trayon G	Petit abcès trayon G
Nœud lymphatique rétro-mammaire	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux	G : Réactionnel / D : normal	G : Réactionnel / D : normal	G : Réactionnel / D : normal
Lait	RAS	RAS	RAS	Hypogalactie	Hypogalactie à G	Hypogalactie à G	Hypogalactie à G	Hypogalactie à G	RAS
Boiterie	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS
Signes oculaires	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS

7.2 Annexes 2 : Courbes de température

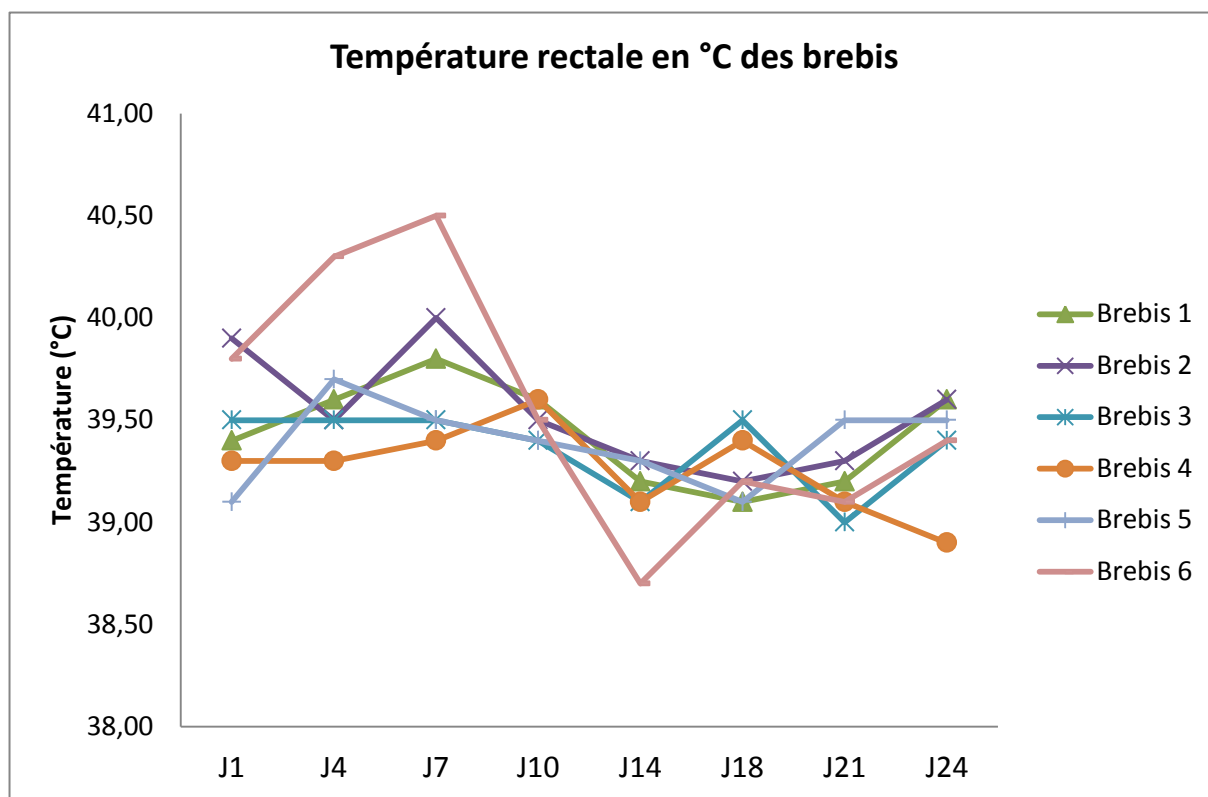


Figure 11 : Courbe des températures de toutes les brebis

NOM : AMBLARD

PRENOM : OCEANE

TITRE : Etude de la diffusion *in vivo* de *Mycoplasma agalactiae* chez la brebis : essai préliminaire

RESUME :

L'agalaxie contagieuse des petits ruminants due à l'infection par *Mycoplasma agalactiae* se traduit par des symptômes mammaires, oculaires et articulaires. *In vitro*, la souche 5632 a une croissance plus rapide que la souche type PG2. Le but de notre étude est de comparer le comportement *in vivo* de ces 2 souches chez six brebis suitées. Après inoculation des 2 souches, nous avons suivi la diffusion dans l'organisme et l'excrétion dans le lait à l'aide d'examens appropriés (examens cliniques, analyses bactériologiques, PCR). Dans les conditions de notre étude, seule la souche PG2 a colonisé l'organisme et a été excrétée dans le lait, la souche 5632 n'ayant été retrouvée que dans le nœud lymphatique drainant le site d'inoculation. Il serait intéressant d'étudier la colonisation et la diffusion de la souche 5632 seule et plus longtemps afin de pouvoir conclure sur la différence de colonisation des 2 souches.

MOTS CLES : MYCOPLASME / MAMELLE / OVIN / AGALACTIE / MAMMITE

ENGLISH TITLE : Study of the dissemination in vivo of *Mycoplasma agalactiae* in ewes : preliminary test

ABSTRACT :

Contagious agalactiae of small ruminants due to *Mycoplasma agalactiae* infection leads to mammary, ocular and joint symptoms. *In vitro*, the 5632 strain is growing faster than PG2 type strain. The purpose of our study is to compare the behaviour, *in vivo*, of these two strains onto six ewes with lambs. After inoculating the two strains, we followed the dissemination in the organism and the excretion in the milk thanks to appropriate exams (clinical exam, bacteriological analyses and PCR). In the conditions of our study, the strain PG2 is the only one to colonize and to excrete in the milk ; the strain 5632 was found only in the lymph node draining the site of injection. It would be interesting to study the colonization and the diffusion of the strain 5632 alone and more longer in order to compare the colonization of two strains.

KEY WORDS : MYCOPLASMA / SHEEP / UDDER / AGALACTIA / MASTITIS